

TESE DE DOUTORAMENTO

**BIOMARCADORES DE ESTRÉS
AMBIENTAL EN LARVAS DE
CHIRONOMUS RIPARIUS MEIGEN,
1804 Y *PRODIAMESA OLIVACEA*
(MEIGEN, 1818) (*DIPTERA*,
CHIRONOMIDAE)**

Pablo Gómez Sande

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN BIODIVERSIDADE E CONSERVACIÓN DO MEDIO NATURAL

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2018



DECLARACIÓN DO AUTOR DA TESE

Biomarcadores de estrés ambiental en larvas de *Chironomus riparius*
Meigen, 1804 y *Prodiamesa olivacea* (Meigen, 1818) (Diptera,
Chironomidae)

D. Pablo Gómez Sande

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

En Santiago, 1 de outubro de 2018

Asdo.





AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR DA TESE

Biomarcadores de estrés ambiental en larvas de *Chironomus riparius* Meigen, 1804 y *Prodiamesa olivacea* (Meigen, 1818) (Diptera, Chironomidae)

D. Fernando Cobo Gradín, Profesor titular do departamento de Xooloxía, Xenética e Antropoloxía física e director da Estación de Hidrobioloxía "Encoro do Con" da USC e Dna. María José Servia García, Profesora do departamento de Bioloxía da UDC

INFORMAN:

De que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D. Pablo Gómez Sande na Estación de Hidrobioloxía "Encoro do Con" da USC baixo a nosa dirección e autorizamos a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC e que como directores desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En Santiago de Compostela, 1 de outubro de 2018

Asdo. Fernando Cobo

Asdo. María J. Servia



Agradecimientos

En primer lugar quiero dar las gracias a mi director, el Doctor Fernando Cobo Gradín además de por la paciente tutela y dirección de este trabajo, por darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación y por enseñarme todo lo que sé sobre Hidrobiología. Por todo ello, gracias.

Debo agradecer también a mi codirectora, la Dra. María J. Servia, los consejos y la ayuda prestada para la elaboración de esta tesis.

Mi más sincero agradecimiento al Doctor Rufino Vieira Lanero, por toda la ayuda técnica, la amabilidad, la atención y todos los buenos consejos y enseñanzas de estos años.

Gracias a todo el equipo de la Estación de Hidrobiología “Encoro do Con”: a la Dra. Sandra Barca Bravo por la paciencia y disciplina empleadas dentro y fuera del laboratorio, a la Dra. M^a del Carmen Cobo Llovo por las revisiones y el apoyo incondicional, a Maite Couto Mendoza por su disposición y ayuda, a la Dra. Lorena Lago Meijide por toda la comprensión y apoyo prestados, a Carlos Morquecho Cobas por su disposición y su infinito humor, al Dr. David José Nachón García por su alegría y optimismo perenne, al Dr. Javier Sanchez Hernández por la ayuda en cuestiones estadísticas, la comprensión y los buenos consejos, al Dr. Sergio Silva Bautista por las fructíferas discusiones científicas y las impagables charlas cotidianas, a todos ellos, gracias además por ser mucho más que compañeros de trabajo.

A los doctores Rosario Planelló Carro y Óscar Herrero Felipe, de la UNED, quiero darles las gracias no sólo por la gran parte que les toca de esta tesis, sino también por los buenos consejos científicos y excelentes momentos disfrutados durante sus estancias.

A los responsables últimos de que todo esto haya sucedido, mi familia: Rosa, Rafa y Dani, gracias por estar siempre a mi lado, por sostenerme.

Este trabajo ha sido realizado gracias a las instalaciones y el equipamiento de la Estación de Hidrobiología “Encoro do Con”.



CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	15
1.1. Introducción	17
1.2. Objetivos	19
CAPÍTULO 2. BREVE REPASO A LA BIOLOGÍA DE LOS QUIRONÓMIDOS	23
2.1. Sistemática y taxonomía	25
2.2. Distribución	27
2.3. Ciclo vital y crecimiento	27
2.4. Morfología	30
2.4.1. El huevo	30
2.4.2. La larva	32
2.4.3. La pupa	36
2.4.4. El imago	38
2.5. Hábitat	40
2.6. Reproducción	41
2.7. Alimentación	44
CAPÍTULO 3. BIOMARCADORES COMO HERRAMIENTA PARA MEDIR EL ESTRÉS AMBIENTAL	45
3.1. Introducción	47
3.2. Utilización de los quironómidos para la evaluación del estrés ambiental	50
3.3. Fundamento de la utilización de los biomarcadores	57
3.3.1. Base teórica	57
3.3.2. Ventajas y limitaciones	60
3.4. Biomarcadores metabólicos	65
3.4.1. Concentración tisular de glucógeno como biomarcador	65
3.4.2. Concentración tisular de proteínas como biomarcador	72
3.4.3. La relación RNA/DNA como biomarcador	75
3.5. Biomarcadores moleculares	79
3.5.1. HSP 70	79

3.6. Enzimas biotransformantes	84
3.6.1. Citocromo P450	85
3.6.2. GST	86
3.7. Disrupción endocrina: el EcR	88
3.8. Biomarcadores morfológicos: deformidades como medida del estrés ambiental	90
3.8.1. Deformidades en quironómidos	91
CAPÍTULO 4. MATERIAL Y MÉTODOS	97
4.1. Toma y procesado de las muestras	99
4.1.1. Estudio estacional	100
4.1.2. Estudio ontogénico	101
4.1.2.1. Determinación de la edad de las larvas de <i>C. riparius</i>	101
4.1.2.2. Determinación de la edad de las larvas de <i>P. olivacea</i>	102
4.1.3. Estudio interpoblacional	104
4.1.4. Procedencia del material estudiado	104
4.1.4.1. Estudio ontogénico y estacional	104
Río Sar	105
4.1.4.2. Estudio interpoblacional	106
<i>Cultivo de Laboratorio</i>	108
<i>Río Con</i>	108
<i>Río Louro</i>	109
4.2. Métodos analíticos	111
4.2.1. Análisis de agua y sedimentos	111
4.2.2. Indicadores Metabólicos	112
4.2.2.1. Extracción y determinación de glucógeno	112
4.2.2.2. Extracción y determinación de proteínas	114
4.2.2.3. Extracción de ácidos nucleicos y determinación de la relación RNA/DNA	116
<i>Fundamento</i>	116
<i>Preparación de las muestras</i>	118
<i>Error de medida, interferencias analíticas y criterios de selección de la metodología de cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofluorimetría y espectrofotometría.</i>	123

4.2.3. Biomarcadores moleculares	133
4.2.3.1. Actividad de la Glutación – S - Transferasa	133
4.2.3.2. Transcripción inversa	133
4.2.3.3. Análisis mediante PCR	134
4.2.3.4. Extracción del DNA del gel de agarosa	135
4.2.3.5. Análisis mediante PCR en tiempo real (Real Time PCR)	136
4.2.4. Análisis de anomalías morfológicas	137
4.2.4.1. Preparaciones microscópicas	137
4.2.4.2. Observación y recuento	138
4.3. Análisis estadístico	141
4.3.1. Pruebas estadísticas de normalidad y homocedasticidad.	141
4.3.2. Análisis de diferencias entre submuestras	141
CAPÍTULO 5. RESULTADOS	143
5.1. Estudio interoblacional	145
5.1.1. Análisis químico	145
5.1.1.1. Análisis cuantitativo de agua	145
5.1.1.3. Análisis cuantitativo de sedimentos	148
5.1.1.4. Análisis cualitativo de agua	151
5.1.1.5. Análisis cualitativo de los sedimentos	153
5.1.1.6. Cálculo del contenido en materia orgánica de los sedimentos	154
5.1.2. Biomarcadores moleculares	156
5.1.3. Indicadores metabólicos	160
5.1.4. Marcadores morfológicos	163
5.2. ESTUDIO ESTACIONAL	165
5.2.1. Parámetros fisicoquímicos	165
5.2.2. Peso medio por larva en <i>C. riparius</i>	166
5.2.3. Peso medio por larva en <i>P. olivacea</i>	168
5.2.4. Concentración tisular de glucógeno en <i>C. riparius</i>	170
5.2.5. Concentración tisular de glucógeno en <i>P. olivacea</i>	172
5.2.6. Concentración tisular de proteínas totales en <i>C. riparius</i>	174
5.2.7. Concentración tisular de proteínas totales en <i>P. olivacea</i>	176
5.2.8. Relación RNA/DNA en <i>C. riparius</i>	178
5.2.9. Relación RNA/DNA en <i>P. olivacea</i>	180
5.3. Estudio ontogénico	184
5.3.1. Peso medio por larva en <i>C. riparius</i>	184

5.3.2. Peso medio por larva en <i>P. olivacea</i>	186
5.3.3. Concentración tisular de glucógeno en <i>C. riparius</i>	188
5.3.4. Concentración tisular de glucógeno en <i>P. olivacea</i>	190
5.3.5. Concentración tisular de proteínas totales en <i>C. riparius</i>	192
5.3.6. Concentración tisular de proteínas totales en <i>P. olivacea</i>	194
5.3.7. Relación RNA/DNA en <i>C. riparius</i>	196
5.3.8. Relación RNA/DNA en <i>P. olivacea</i>	198
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN	203
6.1. Estudio interpoblacional	205
6.2. Estudio estacional	212
6.3. Estudio ontogénico	219
CONCLUSIONES	227
BIBLIOGRAFÍA	233









CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



1.1. INTRODUCCIÓN

La situación de deterioro que sufren los ecosistemas acuáticos, fruto de la actividad humana, ha despertado en los últimos años un creciente interés general por la conservación de estos ambientes que, a su vez, ha estimulado la aparición de un número cada vez mayor de investigaciones relacionadas con la detección de alteraciones de origen antrópico en medios dulceacuícolas.

El elevado número de sustancias que entran en los ecosistemas acuáticos, bien por vertidos directos, bien por contaminación difusa procedentes del medio terrestre, hace que cualquier intento de caracterización química se convierta en una tarea larga y costosa, a lo que hay que añadir las restricciones impuestas por la técnica: la capacidad de análisis y detección, en muchos casos, es muy limitada y dificulta la identificación de los posibles agentes causales del daño. Así, en las últimas décadas asistimos a un vertiginoso desarrollo de métodos de detección y evaluación de la toxicidad de diferentes contaminantes basados en el estudio de sus efectos sobre organismos indicadores, de este modo se puede cuantificar el impacto de la perturbación, pudiendo incluso detectar fuentes de estrés cuya naturaleza no sea química.

LUBCHENKO *ET AL.* (1991) han señalado que un método de biomonitorización ideal debería ser capaz de detectar un problema antes de que éste pueda ejercer un efecto mayor en el ecosistema. La respuesta de los individuos a cualquier tipo de estrés proporciona información antes que la respuesta de poblaciones, comunidades o ecosistemas, ya que el estrés desestabiliza en primer lugar los procesos fisiológicos y del desarrollo de los individuos. Estos efectos a nivel individual ocurren antes de que puedan verse afectados otros parámetros indicadores de la alteración a un nivel de integración

más alto (supervivencia, fecundidad, etc.).

Aunque los trabajos de evaluación del estado de los ecosistemas cada vez emplean más los biomarcadores como herramienta de análisis, la mayoría de las líneas de investigación se centran en la cuantificación de actividades enzimáticas o concentraciones de proteínas clave, que reflejan alteraciones producidas por un determinado contaminante o grupo de ellos (CALLAGHAN *ET AL.*, 1998; STURM & HANSEN, 1999; ZHANG *ET AL.*, 2004; AISEMBERG *ET AL.*, 2005; BINELLI *ET AL.*, 2005; AMIARD *ET AL.*, 2006; BINELLI *ET AL.*, 2006; YI *ET AL.*, 2007; GAGNAIRE *ET AL.*, 2008).

Los biomarcadores específicos resultan muy útiles para evaluar los efectos de un episodio de contaminación del cual se sospecha el agente perturbador, pero cuando se desconoce el agente causal o se trata de realizar un análisis exhaustivo de la situación ecológica, es necesaria la utilización de baterías de distintos biomarcadores (VAN DER OOST *ET AL.*, 1996; CHOI, 1998; DE COEN & JANSSEN, 2003 A; HYNE & MAHER, 2003; DAMÁSIO *ET AL.*, 2008; JEMEC *ET AL.*, 2008), lo que alarga, dificulta y encarece el método.

Algunos investigadores han comenzado a usar los niveles de diferentes macromoléculas e índices derivados de ellas para evaluar los efectos de distintos tipos de estrés sobre los organismos y cómo influyen éstos en las poblaciones, comunidades y ecosistemas. Los organismos del bentos parecen ser la comunidad más adecuada para aplicación de estos métodos en ecosistemas de agua dulce, ya que la mayor parte de ellos están expuestos a las alteraciones presentes en el medio durante al menos una buena parte de su ciclo vital y eso se traduce en un magnífico potencial como indicadores de los efectos de los contaminantes en los ecosistemas acuáticos. Ese potencial se ha visto reflejado en el diseño de numerosísimos índices que permiten caracterizar el grado de dicha contaminación (ROSENBERG & RESH, 1993)

1.2. OBJETIVOS

Las tendencias actuales en el análisis y monitorización ambiental convergen en el estudio de las alteraciones a nivel individual, cuyo objetivo es predecir y prevenir consecuencias en niveles biológicos superiores. En este punto entran en juego los biomarcadores moleculares y dentro de éstos los indicadores metabólicos. En esta categoría se incluye la cuantificación de diferentes macromoléculas que constituyen los organismos y que, por diferentes motivos, aporta una idea general del estado metabólico de los individuos (MEYER, 1990; ABOU-SEIF *ET AL.*, 1993; CASAS *ET AL.*, 2003; SERVIA *ET AL.*, 2006 A).

Hay varios aspectos importantes a tener en cuenta cuando se trata de evaluar el estado de niveles superiores de organización a partir de organismos, se ha de tener presente que estos sufren variaciones fisiológicas importantes relacionadas con el sexo, el estado reproductivo, la edad, la etapa del desarrollo, la dieta y la estacionalidad (MACKEY, 1977; HAMBURGER *ET AL.*, 1996; TIMMERMANN & BRIEGEL, 1999; VREDE *ET AL.*, 2002; CAVALETTO *ET AL.*, 2003; HYNE & MAHER, 2003; SERVIA *ET AL.*, 2006 B; DUTRA *ET AL.*, 2007; SILVA-CASTIGLIONI *ET AL.*, 2007; VINAGRE *ET AL.*, 2007; DUTRA *ET AL.*, 2008; SCHLECHTRIEM *ET AL.*, 2008).

Tomando como base los estudios previos al respecto, intentaremos aportar la información pertinente acerca de los niveles de ciertos indicadores metabólicos, morfológicos y moleculares en larvas de las especies *Chironomus riparius* Meigen, 1804 y *Prodiamesa olivacea* (Meigen, 1818) (*Diptera, Chironomidae*). Así, los objetivos de este trabajo se centran en los siguientes puntos:

1. Estudiar las variaciones de algunos biomarcadores morfológicos, moleculares y metabólicos entre cuatro poblaciones de *C. riparius*; tres de ellas silvestres y una procedente de laboratorio.
2. Determinar y comparar las variaciones estacionales en la concentración de glucógeno, de proteínas totales, y en la relación RNA/DNA en una población silvestre de *Chironomus riparius* y otra de *Prodiamesa olivacea*.
3. Cuantificar las variaciones a lo largo del desarrollo larvario en la concentración de glucógeno, de proteínas totales, y en la relación RNA/DNA en sendas poblaciones silvestres de *Chironomus riparius* y *Prodiamesa olivacea*.
4. Comprobar estadísticamente la relevancia de dichas variaciones interpoblacionales, estacionales y ontogénicas, con respecto a la variabilidad intraespecífica.
5. Realizar una evaluación preliminar de la bondad como indicadores metabólicos del glucógeno, proteínas totales y relación RNA/DNA en las especies estudiadas y en ecosistemas naturales; en función de la variabilidad espacial, estacional y ontogénica.
6. Proponer estrategias para evitar el posible sesgo producido por los factores estudiados, si lo hubiese, y poder emplear con fiabilidad los indicadores metabólicos señalados como herramientas de evaluación ambiental en ecosistemas naturales.







CAPÍTULO 2.
BREVE REPASO A
LA BIOLOGÍA DE LOS
QUIRONÓMIDOS



2.1. SISTEMÁTICA Y TAXONOMÍA

Las dos especies animales utilizadas en este trabajo, *Chironomus riparius* y *Prodiamesa olivacea*, forman parte de la familia *Chironomidae*, un grupo monofilético de dípteros nematóceros tremendamente diversificado. Las larvas de esta familia son un componente frecuente de las comunidades de macroinvertebrados de prácticamente cualquier hábitat dulceacuícola. La posición filogenética de *Chironomidae* dentro del subreino *Eumetazoa* es la siguiente:

Filo *Arthropoda*.

Subfilo *Hexapoda*.

Clase *Insecta*.

Subclase *Pterygota*.

Infraclase *Neoptera*.

Orden *Diptera*.

Suborden *Nematocera*.

Infraorden *Culicomorpha*.

Superfamilia *Chironomoidea*.

Familia *Chironomidae*

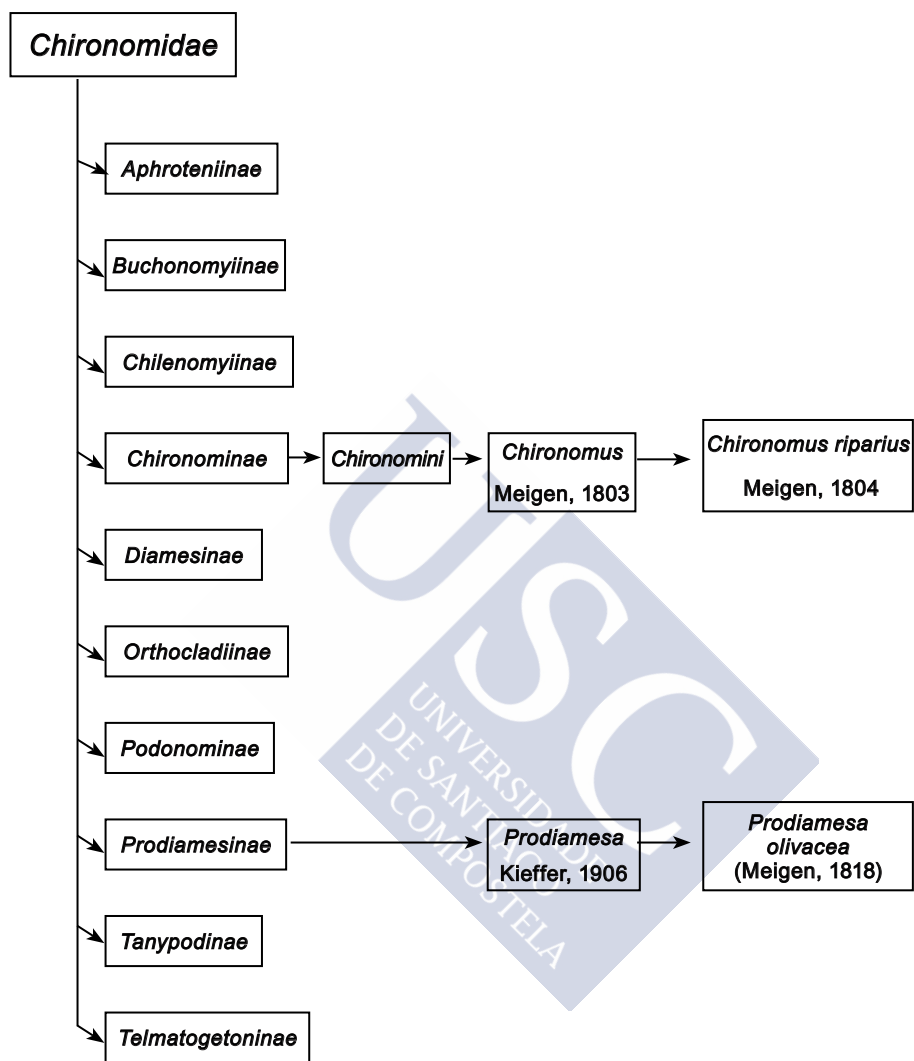


Figura 1. Subfamilias pertenecientes al grupo *Chironomidae* y posición de las dos especies estudiadas en esta tesis.

2.2. DISTRIBUCIÓN

Los quironómidos son la familia de insectos más ampliamente distribuida, prácticamente no existe una masa de agua, no importa la latitud o la altitud, en la cual no puedan vivir sus larvas, encontrándose representantes de la familia desde el Ártico hasta el Antártico y desde alturas como las del Himalaya hasta profundidades de más de 1000 m en el lago Baikal (ARMITAGE *ET AL.*, 1995); y, por supuesto, son una parte importante de la entomofauna de la Península Ibérica (SORIANO *ET AL.*, 1997).

Con frecuencia es el grupo de Insectos más abundante y diverso en medios acuáticos continentales. ARMITAGE *ET AL.* (1995) calcularon que pueden existir en el mundo más de 15.000 especies de quironómidos, aunque esto es sólo una estima y la cifra puede ser incluso mayor.

2.3. CICLO VITAL Y CRECIMIENTO

Su ciclo vital comprende cuatro estados de duración desigual: huevo, larva, pupa e imago. Todo el ciclo puede durar desde unos pocos días hasta años dependiendo de la especie y los factores ambientales (LINDEGAARD, 1997).

El desarrollo del embrión, desde la puesta de los huevos, hasta que se produce la eclosión dura entre 2.5 y 6 días (THIENEMANN, 1954), pero éste depende en gran medida de la temperatura y de la duración global del ciclo (STRIXINO & STRIXINO, 1985). El número de huevos puestos por una hembra varía mucho de una especie a otra. Por ejemplo, la hembra de *Camptochironomus tentans* pone entre 1400 y 3300, mientras que la de *Corynoneura scutellata* pone únicamente entre 20 y 35 huevos (ALBU, 1980).

El exoesqueleto de los quironómidos, al igual que ocurre en el resto de insectos y otros artrópodos, limita su crecimiento ya que impide que aumente su volumen corporal de forma continua y constante como en otros animales. En lugar de eso su crecimiento es discontinuo o escalonado: para

incrementar su tamaño corporal primero deben deshacerse del esqueleto, para después crear uno más grande, este proceso, la muda o ecdisis, es una fase breve en la que se produce el crecimiento efectivo en volumen.

Cada muda está precedida de una fase de intermuda relativamente larga, en la que el organismo almacena sustancias de reserva, incrementa el número celular e incluso aumenta su masa, pero no su tamaño. El aumento del volumen es discontinuo por los efectos de la cutícula rígida; el peso del organismo sigue un patrón más continuo; aunque también marcado por los breves períodos de muda en los que la masa corporal se reduce debido a la pérdida que supone la eliminación del viejo esqueleto y el gasto derivado del crecimiento tisular y de la deposición de la nueva cutícula.

Dentro de la clase *Insecta* existe una amplia variabilidad interespecífica en el número de mudas o estados, como corresponde a la amplia diversidad específica del grupo, llegando en casos, como el de los tisanuros del género *Thermobia*, que continúan creciendo y mudando en la etapa adulta, a las 60 ecdisis. Incluso dentro de la misma especie el número de mudas realizadas durante su vida puede variar de unos individuos a otros en función de distintos factores, tanto innatos como ambientales (genética, temperatura, estado nutricional, etc.).

El desarrollo de las larvas de los quironómidos, generalmente se divide en cuatro estadios larvarios, correspondientes a los cuatro períodos intermuda, caracterizables mediante las medidas de la cápsula cefálica (MCCAULEY, 1974), que puede llegar a duplicar su tamaño de un estadio al siguiente. La duración tanto de cada estadio como de la fase larvaria completa es altamente variable depende de varios factores como la especie, el sexo, temperatura ambiental, alimento disponible, fotoperíodo, etc. (INEICHEN ET AL, 1979; OLIVER, 1971).

LINDEGAARD (1997) los define como especies oportunistas, que crecen rápido cuando las condiciones ambientales son favorables (temperatura, alimento, etc.) y son capaces de ralentizar su desarrollo y su crecimiento cuando no lo son. Como datos orientativos, SERVIA (2001) señala que las larvas de *C. riparius* mantenidas en condiciones controladas (temperatura

ambiente: 22 ± 2 °C, agua artificial y alimentación *ad libitum*) tardan, de media, tres días en completar el primer estadio de desarrollo, otros tres en el segundo, cinco en el tercer estadio y diez días en el cuarto; un total de veintiún días para completar todo el desarrollo larvario. La duración del estado de pupa es mucho más corta que la fase larvaria, varía desde algunas horas a varios días (BROCK, 1960; DARBY, 1962). La fase de imago también es muy breve en comparación con el resto del ciclo, su duración es de entre un par de días y dos semanas.

Generalmente las cohortes suelen estar bien definidas de manera que las emergencias y las puestas se realizan de forma más o menos sincrónica. Muchas especies son uni o bivoltinas, pero no es raro observar cuatro o cinco generaciones anuales en especies que habitan en las riberas de lagos y en ambientes lóticos.



2.4. MORFOLOGÍA

2.4.1. El huevo

Los huevos de los quironómidos presentan por lo general una forma más o menos elíptica o reniforme, siendo el extremo más estrecho el correspondiente a la zona donde se sitúa la parte anterior del embrión (ALBU, 1980). Su tamaño varía considerablemente dependiendo de la especie. Además, durante el desarrollo del embrión, el huevo sufre variaciones de tamaño. La longitud de los mismos se encuentra entre los 0.15 y 0.6 mm (LINDEGAARD, 1997).

La cubierta externa del huevo carece, por lo general, de características morfológicas destacables, aunque algunas especies muestran un micropilo diferenciado (ALBU, 1980; NOLTE, 1993; LINDEGAARD, 1997). La única característica externa subrayable es, en ocasiones, el color de su corion, que en algunas especies sufre además un oscurecimiento progresivo tal y como describió NOLTE (1993). Este mismo autor señala también que en la mayor parte de los casos, los huevos son puestos por la hembra reunidos en una matriz gelatinosa, que se expande en contacto con el agua y cita únicamente la existencia de una subfamilia, *Telmatogetoninae*, en la que los huevos son depositados de forma individual.

Así, los huevos son depositados, en la mayor parte de los casos, en filas o madejas incluidas en una envuelta gelatinosa que, en contacto con el agua, aumenta de volumen varias veces y se vuelve extremadamente pegajosa, lo que asegura que la mayoría de las puestas queden fijadas a un sustrato adecuado (PINDER, 1995).

La morfología externa de la puesta puede variar desde formas alargadas y cilíndricas hasta formas más o menos globulares o semejantes a una lágrima. En su interior, la disposición de los huevos es asimismo variable, pudiendo ser ésta irregular o bien lineal que puede adoptar formas helicoidales, características que permiten, a veces, la identificación de la especie o grupo al que pertenecen (THIENEMANN, 1954; NOLTE, 1993;

LINDEGAARD, 1997).

En algunas especies de la tribu *Chironomini*, sobre todo del género *Chironomus*, las puestas presentan además en su interior una serie de filamentos cuya disposición varía según la especie y que podría ser también de utilidad para su identificación (STRENZKE, 1959).

Tanto la morfología de la puesta como la disposición de los huevos en su interior poseen un significado filogenético dentro del grupo (THIENEMANN, 1954; NOLTE, 1993). Además, la envuelta cumple una función protectora, ya que no se descompone en el agua, protegiendo los huevos de los ataques de bacterias y hongos y puede servir además como alimento a las larvas recién eclosionadas.

La disposición de los huevos en su interior y la morfología de la puesta son muy variables (ver revisión de NOLTE, 1993). Las puestas de *C. riparius* presentan una forma alargada, y contienen entre 1300 y 1800 huevos dispuestos en hileras que forman bucles simulando una hélice (figura 2) mientras que las de *P. olivacea* mantienen una disposición globular con bucles muy alargados y con un aspecto más desorganizado (figura 3).



Figura 2. Puesta de *Chironomus riparius*.



Figura 3. Puesta de *Prodiamesa olivacea*.

2.4.2. La larva

Las larvas de primer estadio presentan generalmente una morfología particular. Así, las larvas recién eclosionadas o lárvulas (figura 4) poseen con frecuencia largas sedas laterales a lo largo del abdomen, estructuras que aumentan su capacidad natatoria, lo que sumado a elevada movilidad esta fase incrementa su capacidad de dispersión (PINDER, 1995). La lárvula nada libremente hasta que encuentra un sedimento adecuado (cantidad de alimento, tamaño de las partículas, etc.) y se establece en él, haciéndose bentónica.

La mayoría construye estuches larvarios de diferente forma y consistencia. Éstos pueden estar fijados a las piedras del lecho o a la vegetación, enterrados en el sedimento de zonas lénticas o bien pueden ser arrastrados en sus desplazamientos (LINDEGAARD, 1997). En el caso de especies que viven en sedimentos finos, como *Chironomus riparius*, los tubos se encuentran parcialmente enterrados, y están formados por detritus, algas y otras partículas sedimentarias, apelmazadas con secreciones de las glándulas salivares (EDGAR & MEADOWS, 1969). Estas construcciones los protegen frente a los depredadores, pero además disminuyen el riesgo de que los individuos sean arrastrados por la corriente. Otras especies no construyen tubos y viven sobre el fondo o ligeramente enterradas.

Las larvas de quironómidos son apnéusticas (figura 6), por lo que dependen de la existencia de unos niveles de oxígeno adecuados para asegurar un gradiente de difusión suficiente. Normalmente la concentración de oxígeno en el agua no suele suponer un problema, aunque en especies que, como *Chironomus riparius*, viven enterradas en sedimentos con alto contenido en materia orgánica, el consumo de oxígeno existente en estos espacios puede provocar disminuciones drásticas de su concentración en pocos milímetros de profundidad (WATLING, 1991). Por ello, muchas larvas, especialmente las pertenecientes a la tribu *Chironomini*, y entre ellas *Chironomus riparius*, presentan hemoglobina en el líquido circulatorio lo que les confiere un característico color rojo (figuras 5).

Las larvas de quironómidos son eucéfalas, con una cápsula cefálica bien

desarrollada y esclerotizada. El tamaño de los individuos de cuarto estadio varía entre 2 y 30 mm (LINDEGAARD, 1997).

Su cuerpo presenta tres divisiones principales: cabeza, tórax y abdomen. En la descripción detallada de cada una de estas regiones utilizaremos la nomenclatura definida por SAETHER (1980).

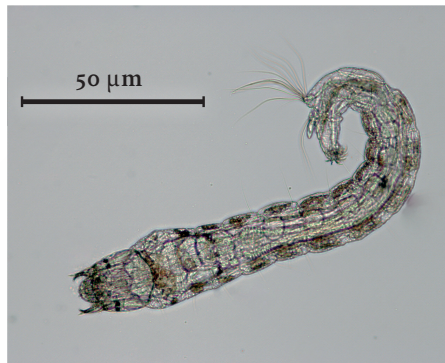


Figura 4. Larva de estadio I de *Chironomus riparius*.



Figura 5. Larva de estadio IV de *Chironomus riparius*.

La cabeza presenta una cubierta completamente esclerotizada, la cápsula cefálica, formada dorsalmente por un apotoma frontal que se une a un par de genas lateroventrales. Estos escleritos contienen un cierto número de sedas, que pueden ser utilizadas en algún caso para el reconocimiento de géneros dentro de ciertos grupos (KOWALYK, 1985).



Figura 6. Larva de estadio IV de *P. olivacea*

Poseen de una a tres manchas oculares situadas lateralmente y antenas formadas por un número variable de segmentos, entre cuatro y ocho. La relación entre la longitud y la anchura de la cabeza se conoce con el nombre de Índice Cefálico, dato que constituye un importante carácter sistemático (ALBU, 1980).

El tórax está formado por tres segmentos: protórax, mesotórax y metatórax (T-I, T-II y T-III). El primero de ellos (T-I) presenta generalmente, en la parte ventral, un par de pseudópodos con uñas quitinosas en su extremo denominados parápodos, aunque, especialmente en algunos grupos de quironómidos terrestres, estos parápodos pueden estar fusionados,

reducidos o incluso desaparecer (CRANSTON, 1995).

En esta región surgen, al final del estadio III o comienzos del IV, unas estructuras denominadas discos imaginales, que darán lugar a las alas y patas del imago. Son 10, tres pares para las patas (T-I, T-II y T-III), otro para las alas (T-II) y otro para los halterios (T-III). Se originan inmediatamente debajo del tegumento, en posición medio-lateral y a medida que se desarrollan y aumentan de tamaño van ganando espacio hacia la zona ventral.

Estas estructuras, que poseen un importante valor de caracterización ontogénica, han sido minuciosamente descritas, histológica y morfológicamente, en: *C. thummi* (WÜLKER & GÖTZ 1968), *C. tetans*, (INEICHEN ET AL. 1983) y *C. riparius* (GODDEERIS ET AL. 2001). Tanto las estructuras como esta clasificación en fases proporciona un buen sistema para la determinación del grado de desarrollo de las larvas, también en *P. olivacea*, aunque no exista ningún trabajo que los describa específicamente.

Cuando las larvas de último estadio ya están próximas al momento de la pupación, los discos imaginales están tan desarrollados que los tres segmentos torácicos aparecen dilatados y claramente diferenciados de los segmentos abdominales. Cuando la larva alcanza este estado se la denomina prepupa.

El abdomen está compuesto por nueve segmentos y es generalmente de forma cilíndrica, aunque en algunos casos puede estar comprimido dorsoventralmente. La mayor parte de los segmentos no posee estructuras destacables. Sin embargo, el último segmento presenta, al igual que el primer segmento torácico, un par de pseudópodos, que pueden estar fusionados o reducidos.

Además, en la región preanal, presenta un par de tubérculos denominados procercos, que portan un largo penacho de sedas. Rodeando el ano existen entre uno y tres pares de túbulos anales, que intervienen en la regulación iónica de la larva (STRENZKE & NEUMANN, 1960).

En algunos géneros de la tribu *Chironomini* (*Chironomus*, *Glyptotendipes*...),

algunas especies poseen uno o dos pares de túbulos ventrales en el octavo segmento abdominal, y en algunos casos incluso un par de túbulos laterales más cortos en el séptimo, como es el caso de *C. riparius*. Dichos túbulos se asocian con funciones de intercambio gaseoso (HARNISCH, 1954; NAGELL & ORRHAGE, 1981).

Además, en los segmentos VII y VIII, en posición ventral y paralelamente a los discos imaginales torácicos, se desarrollan los primordios de la genitalia de los imagos, denominados discos imaginales genitales, que constituyen el único carácter observable de dimorfismo sexual en las larvas. Dichas estructuras han sido ampliamente estudiadas, (WÜLKER & GÖTZ, 1968; WÜLKER *ET AL.*, 1979; INEICHEN *ET AL.*, 1983) y poseen el mismo valor para la determinación de la fase del desarrollo que sus homónimos torácicos.

2.4.3. La pupa

La pupación de las larvas de *C. riparius* se produce dentro del tubo. Una vez madura, la pupa asciende hasta la superficie del agua ayudada por movimientos natatorios del abdomen y por la presencia en su interior de gases expulsados por el adulto farado. El tiempo que tarda en emerger el imago varía según las especies, pudiendo ocurrir en unos segundos o durar hasta 30 minutos (ALBU, 1980).

La fase de pupa en los quironómidos suele ser muy breve, aunque especies presentes en lagos árticos puede durar todo el invierno y parte de la primavera, hasta que el hielo de la superficie desaparece (LINDEGAARD, 1997). En esta fase se producen las transformaciones morfológicas que llevan al paso del estado de larva al de imago. La pupa presenta dos regiones diferenciadas: el cefalotórax, en la parte anterior, y el abdomen, que se presenta generalmente comprimido dorsoventralmente.

El cefalotórax tiene bajo la misma cubierta la cabeza y el tórax del futuro adulto. Contiene, en la parte anterior, las vainas que protegen los ojos, las antenas y las piezas del aparato bucal. Ya en la región torácica

pueden observarse las pterotecas y las vainas de las patas, así como los órganos respiratorios, llamados cuernos torácicos, situados en posición mediolateral.

Los patrones de distribución y morfología de las sedas y ornamentación de la cutícula, así como la morfología de los cuernos torácicos, constituyen las características de mayor valor taxonómico. Por ejemplo, las pupas de las subfamilias *Podonominae* y *Tanypodinae* presentan cuernos torácicos abiertos en su extremo, de forma que pueden tomar oxígeno directamente del aire, permaneciendo constantemente cerca de la superficie o ascendiendo a ella cada vez que necesitan oxígeno (LANGTON, 1995).

Otras pupas, como las de *Chironomus riparius*, que permanecen hasta el momento de la eclosión dentro del tubo larvario, toman del agua el oxígeno que necesitan. Por ello, sus cuernos torácicos no presentan aberturas, son más o menos grandes y pueden estar divididos formando penachos filamentosos que aumentan la superficie en contacto con el agua, e incluso pueden contener traqueolas en su interior conectadas directamente con el sistema traqueolar del adulto (COFFMAN, 1979). En el extremo opuesto se encuentran aquellas pupas que viven en medios oxigenados, y que presentan cuernos torácicos escasamente desarrollados, como en algunos *Orthocladius* (LANGTON, 1995).

El abdomen está compuesto por ocho segmentos similares y uno terminal modificado que forma los lóbulos anales y la vaina genital. En muchos casos los lóbulos anales forman verdaderas paletas natatorias, que la pupa emplea para subir a la superficie. Cada uno de los segmentos presenta, tanto en la región tergal como en la esternal, una profusa ornamentación, con valor taxonómico, compuesta por sedas, tubérculos, espinas o ganchos (LINDEGAARD, 1997).

Además, los lóbulos anales pueden ver aumentada su eficacia por la existencia de una gran corona de largos filamentos en su borde externo. Una vez se produce la emergencia, todas estas características son visibles en las exuvias pupales, que quedan flotando en la superficie del agua después de que el imago haya emergido.

2.4.4. El imago

Los imagos son de tamaño variable, entre 1.5 y 25 mm, existiendo un notable dimorfismo sexual. En la cabeza se observa una de las principales diferencias entre machos y hembras. En los machos de muchas especies los flagelómeros de las antenas presentan largas sedas que les dan un aspecto plumoso, mientras que en las hembras las sedas, si existen, son escasas y poco conspicuas. En la cabeza destacan asimismo los ojos compuestos, que tienen forma arriñonada y, en determinadas especies, presentan microtriquias entre los ommatidios. Las piezas bucales están reducidas, y únicamente son reseñables los palpos maxilares (CRANSTON, 1995).

El tórax es la región en la que se insertan las patas, alas y halterios. Es típicamente convexo en la parte dorsal, debido a que contiene la musculatura necesaria para el vuelo. El protórax es pequeño, el mesotórax es el segmento más desarrollado, y el metatórax es el segmento más reducido.

Las alas, situadas en el mesotórax, presentan numerosas características de importancia taxonómica, como la venación alar, los patrones de distribución de sedas y, en muchos casos, la pigmentación tanto de la membrana como de las microtriquias. Son importantes también las estructuras de articulación de las alas con el tórax (ALBU, 1980; CRANSTON, 1995). A ambos lados del metatórax se encuentran los halterios.

Las patas, relativamente largas, presentan una coxa y un trocánter pequeños, un largo fémur, la tibia y cinco tarsómeros terminales, el último de ellos con dos uñas. Las espinas o espolones presentes en la tibia, así como la relación de tamaño entre diferentes segmentos y la ornamentación general de las patas son utilizadas como caracteres de determinación en las claves del grupo (CRANSTON, 1995).

El abdomen presenta los ocho primeros segmentos comprimidos dorsoventralmente, siendo éstos más cortos y anchos en las hembras que en los machos. El último segmento contiene la genitalia de los adultos, estructura de gran importancia diagnóstica (ALBU, 1980). En los machos, el terguito del

segmento IX presenta generalmente una extensión puntiaguda denominada punta anal. Además, lateralmente se insertan unos apéndices que reciben el nombre de gonocoxito en la región basal y gonostilo en la distal. Asociados al primero de ellos pueden presentarse otros apéndices denominados en su conjunto *volsellae*.

2.5. HÁBITAT

Las tres primeras fases del ciclo vital se desarrollan en todo tipo de medios acuáticos, incluyendo hábitats tan especializados como el agua axilar de plantas, troncos huecos (dendrotelmata), fuentes termales, charcas intermareales, lagos salados, etc. (COBO, 1988; LINDEGAARD, 1997). Existen especies que se desarrollan dentro de plantas acuáticas, y otras que son foréticas, comensales o ectoparásitas de otros grupos animales como gasterópodos, bivalvos, efemerópteros o briozoos (TOKESHI, 1995; LINDEGAARD, 1997). ALBU (1980) estima que existen entre 70 y 100 especies que tienen un modo de vida semiterrestre o terrestre (obligatorio o no) y que dependen de la humedad del sustrato (suelo, hojarasca, hendiduras en los árboles, etc.). El imago por el contrario es aéreo, lo que les permite dispersarse con facilidad y colonizar nuevas zonas o remontar la distancia perdida por arrastre durante las otras tres fases vitales en ambientes lóticos.

2.6. REPRODUCCIÓN

El imago puede volar segundos después de emerger y vive apenas unos días. La cópula tiene lugar generalmente en el aire, cuando una hembra se acerca al enjambre de machos, aunque determinadas especies copulan en otros lugares como el suelo, la superficie del agua o la vegetación (LINDEGAARD, 1997).

Los enjambres se generan a alturas variables, en función del tamaño de los individuos. Éstos pueden formar a veces una columna de gran tamaño, en la que pueden diferenciarse estratos. Así se encuentran, en la base de la columna, enjambres de especies de pequeño tamaño, como las de los géneros *Corynoneura*, *Tanytarsus* o *Cricotopus*; más arriba se encuentran los enjambres de especies de tamaño medio, como las de *Polypedilum*, *Phaenopsectra* o *Cryptochironomus*, mientras que en el extremo superior se forman enjambres de especies más grandes, pertenecientes a géneros como *Chironomus*, *Glyptotendipes*, etc. (ALBU, 1980).

Tras la cópula, la hembra elige el lugar donde depositar los huevos. Después de la puesta, algunas hembras mueren inmediatamente, mientras que otras pueden vivir aún unas horas. La muerte se produce generalmente debido a que, tras el vaciado de las gónadas, en el cuerpo de las hembras se forman unas cavidades que se llenan de hemolinfa, y que entorpecen la circulación (Albu, 1980). En la naturaleza, los cadáveres de las hembras quedan a menudo adheridos a las puestas, y son atacadas por hongos, que las recubren de una película de micelio blanquecina o amarillenta.

2.7. ALIMENTACIÓN

Las larvas de *Chironomus riparius* y de *Prodiamesa olivacea* son detritívoras de tipo colectores de depósito, como la mayoría de los quironómidos, aunque es importante destacar que fundamentalmente son oportunistas y presentan un modelo de alimentación facultativo (BERG, 1995). La excepción la constituyen grupos con un tipo de alimentación característica, como los *Tanipodinae*, que en su mayoría son carnívoros.

En el caso de *C. riparius* las larvas asoman la cabeza y la parte anterior del cuerpo fuera del tubo para ingerir sedimento que se encuentra en la región que rodea a éste. De todo el sedimento ingerido, las larvas aprovechan sólo los compuestos más fácilmente digeribles, y pueden migrar en busca de zonas con mayor cantidad de alimento, a pesar de que la construcción de un tubo nuevo implica un gasto considerable de energía (VOS, 2001).

La mayoría de los imagos no se alimentan, ya que sus piezas bucales suelen estar muy atrofiadas: faltan las mandíbulas, las maxilas están reducidas a un par de palpos con función sensorial, e incluso el tubo digestivo puede no ser funcional (OLIVER, 1971; ARMITAGE ET AL., 1995). Sin embargo existen referencias de algunas especies que liban néctar (LINDEGAARD, 1997).





CAPÍTULO 3.
BIOMARCADORES
COMO HERRAMIENTA
PARA MEDIR EL ESTRÉS
AMBIENTAL



3.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos de evaluación ambiental pueden ser divididos en dos grupos: por una parte, la detección de las alteraciones ambientales antrópicas y eventualmente su cuantificación (análisis fisicoquímicos), y por otro, el efecto que estas alteraciones producen sobre los organismos; bien a nivel individual, bien a nivel de población o comunidad. Ambas aproximaciones metodológicas no son excluyentes, todo lo contrario, es su uso conjunto el que ofrece un resultado más fiable a la hora de evaluar de forma precisa el estado de los ecosistemas y de los organismos que los componen (LAGADIC *ET AL.*, 1997).

Los análisis fisicoquímicos proporcionan información precisa de las condiciones abióticas del medio, pero no son efectivas a la hora de cuantificar los efectos ecológicos de muchos contaminantes y perturbaciones, ya que estos dependen de interacciones con otros elementos bióticos y abióticos del sistema (fenómenos de adsorción, bioturbación, etc.), así como por sinergias y antagonismos entre contaminantes o incluso por el estado fisiológico y de desarrollo de los organismos (LAGADIC *ET AL.*, 1997).

Así, ante la necesidad de nuevos mecanismos para valorar los efectos de las perturbaciones antrópicas sobre el ecosistema, a principios del S. XX proliferaron los métodos basados en el análisis de parámetros biológicos, principalmente a niveles supraespecíficos. CAIRNS & PRATT (1993) sitúan el origen de la tradición europea en el uso de macroinvertebrados para estudios de biomonitorización en los trabajos de KOKWITZ & MARSSON (1908, 1909), que dieron origen al Sistema de Saprobios, en el que se establece el grado de contaminación por materia orgánica de un medio acuático en función de observaciones sobre la presencia de determinados organismos.

Posteriormente han ido apareciendo progresivamente nuevos sistemas, basados muchos de ellos en el estudio de las comunidades como indicadores, como son los índices de diversidad, de abundancia, etc. ROSENBERG & RESH (1993), en la introducción de la obra por ellos editada, en la que se realiza un

análisis exhaustivo de los sistemas de biomonitorización mediante el uso de macroinvertebrados bentónicos en aguas dulces, ofrecen una definición del concepto de biomonitorización, que toman a su vez de MATTHEWS *ET AL.* (1982): “La monitorización biológica puede definirse como el uso sistemático de respuestas biológicas para la evaluación de cambios en el medio con el propósito de usar esta información en programas de control de calidad. Estos cambios son debidos con frecuencia a fuentes antrópicas...”.

Posteriormente surgió el concepto de bioindicadores, acuñado y definido por GUELORGET Y PERTHUISOT (1984) como especie o grupo de especies que, por su presencia o abundancia, aportan información de una o más propiedades del ecosistema del que forman parte.

Por su parte, GERHARDT (2000) intenta esclarecer las diferencias entre los distintos conceptos dentro del campo de la biomonitorización, y designa como especie biomonitora a aquellas especies que pueden utilizarse para estudiar la situación y evolución del medio, mientras que denomina especie bioindicadora *sensu stricto* a especies que pueden indicar una cierta situación momentánea o instantánea en el medio natural.

Existen dos tipos particulares de especies que ilustran perfectamente la división hecha por GERHARDT (2000): las bioacumuladoras y las centinela. El primer tipo es un ejemplo de lo que llama especie biomonitora, y el segundo se ajusta a la definición de especie bioindicadora.

Las especies bioacumuladoras están exclusivamente relacionadas con la contaminación química y se definen como aquellas especies que por su modo de vida o sus características fisiológicas y metabólicas, presentan la capacidad de bioacumular contaminantes hasta niveles netamente superiores a los existentes en el medio (LAGADIC *ET AL.* 1997). La bioacumulación puede darse por absorción directa del medio, o siguiendo la cadena alimenticia. En este último caso hablamos de bioamplificación ya que, a medida que ascendemos en la red trófica, se incrementa el efecto bioacumulador (RAMADE, 1979; AMIARD & AMIARD-TRIQUET, 1980).

Entre otras características, las especies biomonitoras como las

bioacumuladoras deben ser, en general, sésiles, abundantes al menos localmente, relativamente resistentes a los tóxicos investigados, y con un ciclo vital lo suficientemente largo como para que les confiera capacidad de integración de las variaciones de la calidad del medio a lo largo del tiempo (LAGADIC *ET AL.*, 1997).

Por otra parte, una especie centinela, ejemplo de bioindicadora, es toda aquella susceptible de ser utilizada como indicador de la presencia y toxicidad de al menos un contaminante o fuente de estrés. Debe además permitir evaluar los efectos potenciales de dicha alteración sobre la salud humana o la calidad del medio (LOWER & KENDALL, 1990; SHEFFIELD & KENDALL, 1997). Sin embargo, a diferencia de las biomonitoras, no tienen por qué ser resistentes a los agentes estresantes, ni tener ciclos de vida largos, simplemente deben mostrar algún síntoma inequívoco de exposición a un agente estresante.

Nótese que a lo largo de la historia de la evaluación ambiental la secuencia en el desarrollo de nuevos métodos evolucionan desde el análisis de comunidades hacia niveles menores de organización; tras el nivel específico (especies bioindicadoras y biomonitoras) el siguiente paso es el nivel infraespecífico, el cual incluye marcadores moleculares, bioquímicos, histológicos, citológicos, fisiológicos y etológicos de individuos provenientes del medio. Son los denominados de forma genérica como biomarcadores.

3.2. UTILIZACIÓN DE LOS QUIRONÓMIDOS PARA LA EVALUACIÓN DEL ESTRÉS AMBIENTAL

Una gran parte de los estudios de bioindicación que se han llevado a cabo en medios de agua dulce se han centrado en la investigación de especies de peces o de macroinvertebrados (CLARKE, 1994). Ambos grupos presentan una serie de características que favorecen su uso como bioindicadores (ver CLEVELAND *ET AL.*, 2000 para ventajas del uso de peces). En la práctica, sin embargo, los macroinvertebrados constituyen, con diferencia, el grupo más frecuentemente utilizado para dicha función (HELLAWELL, 1986), y dentro de éstos, en las últimas décadas se ha producido un incremento notable en el número de publicaciones relacionadas con la utilización de los quironómidos como bioindicadores (ROSENBERG, 1992); además de ser un organismo extensísimamente utilizado en diferentes disciplinas científicas, incluso en Medicina forense (GONZALEZ *ET AL.*, 2015).

Ello es debido a que presentan una serie de ventajas importantes, en gran parte comunes a todos los macroinvertebrados (cf. ROSENBERG, 1992), aunque en algunos casos son más acusadas y en otros menos favorables. Entre ellas pueden citarse las siguientes:

- **Distribución ubicua:** la composición y estructura de comunidades bentónicas son similares entre ecosistemas de agua dulce del mismo tipo ubicados en áreas zoogeográficas distintas y entre diferentes tipos de ecosistemas acuáticos -y de hábitats dentro de éstos- ubicados en la misma zona. De manera que, con ligeras modificaciones los métodos de evaluación ambiental desarrollados utilizando el macrozobentos son aplicables a una gran cantidad de ecosistemas y tienen un gran rango geográfico.
- **Comunidades con alta biodiversidad:** el alto número de especies, géneros y familias, ofrece un amplio espectro de respuestas a los impactos medioambientales otorgando a los métodos basados en estas comunidades versatilidad y sensibilidad ante distintos tipos de estrés.

- **Sedentarias:** Obviando la fase aérea de muchos de los grupos y el arrastre ocasional por deriva en ambientes lóticos, los organismos del bentos suelen poseer un territorio vital reducido, lo que permite el análisis espacial de los efectos de los distintos impactos.
- **Ciclos vitales largos:** lo que permite la detección de alteraciones ya pasadas, actuando como un registro temporal de perturbaciones. En el caso de los quironómidos los ciclos pueden ser relativamente cortos en aguas templadas, lo que merma su capacidad para registrar alteraciones ocurridas hace tiempo.
- **El muestreo cualitativo es simple** y el equipo requerido es muy poco costoso. Esto facilita su utilización y aplicación en lugares y situaciones diversos.
- **Multitud de sistemas de análisis de datos:** Se han desarrollado abundantes métodos y han sido ampliamente utilizados en estudios a nivel de comunidad, que constituyen un buen punto de partida para el desarrollo de otros.

Sin embargo existen también ciertas limitaciones que, como en el caso de las ventajas, son en su mayor parte compartidas con la utilización de la comunidad bentónica:

- **Variabilidad de respuesta:** la familia *Chironomidae* es tremendamente diversa en cuanto a número de especies y obviamente pueden existir diferencias de respuesta entre especies diferentes, por lo que es imprescindible el conocimiento de la fauna local y el correcto diseño de los programas de vigilancia y control.
- **Respuesta a otros factores** no relacionados con la calidad del agua-La distribución y abundancia de cualquier especie pueden verse afectadas por condiciones naturales cambiantes, como la velocidad de la corriente, la naturaleza del sustrato, la disponibilidad de alimento, etc. Esto genera la necesidad de un conocimiento profundo de la autoecología de las especies y un diseño experimental muy cuidadoso.
- **Estacionalidad en abundancia y distribución.** Esto puede generar

problemas de muestreo durante determinados períodos, en hábitats específicos o a la hora de comparar muestras tomadas en diferentes épocas, que se pueden evitar si se conocen los ciclos vitales de las especies.

- **Deriva.** La corriente puede arrastrar a individuos a hábitats en los que no suelen presentarse, dando así su presencia una falsa información. Por ello, el conocimiento de las preferencias de hábitat y del comportamiento de deriva de las especies es fundamental.
- **Dificultades en el muestreo cuantitativo:** los muestreos cuantitativos requieren un alto número de muestras para alcanzar una precisión razonable, por lo que la toma de muestras, la separación y la identificación de los individuos se convierte en una tarea bastante larga y tediosa.
- **Dificultades taxonómicas:** por lo que respecta a los quironómidos, algunos grupos son bien conocidos y existen claves disponibles para su identificación a nivel específico incluso en fase larvaria. Sin embargo, todavía existen lagunas importantes, sobre todo en la identificación de sus estadios larvarios además de especies indistinguibles en dicha fase.

Además de todo lo referido, es importante destacar el hecho de que los quironómidos se encuentran expuestos a los contaminantes durante la fase más crítica de su ciclo vital, ya que el período larvario no sólo es el más largo del ciclo, sino que generalmente es también el único durante el cual tiene lugar la alimentación. Por ello, y debido a que muchas sustancias tóxicas se encuentran en los sedimentos ligadas a las partículas orgánicas que constituyen la dieta de muchas especies, las larvas se ven expuestas a una carga importante de diferentes tipos de contaminantes y a través de diferentes vías.

A lo largo de estos últimos años los quironómidos, al igual que el resto de macroinvertebrados, han sido utilizados como bioindicadores en diferentes tipos de estudios, desde el nivel de organismo hasta el nivel de comunidad. CLARKE (1994) clasifica dichos trabajos en cuatro categorías principales:

- Bioacumulación. Dentro de esta categoría, el autor se refiere a técnicas analíticas diseñadas para la medición de la presencia y concentración de sustancias xenobióticas en los individuos.

Las larvas de quironómidos, debido a su modo de vida y tipo de alimentación, han sido utilizadas frecuentemente en este tipo de estudios (KRANTZBERG & STOKES, 1988; 1989; 1990; TIMMERMANS & WALKER, 1989; TIMMERMANS & DAVIDS, 1989; BAUDIN & NUCHO, 1992; JANSSENS DE BISTHOVEN *ET AL.*, 1992; TIMMERMANS *ET AL.*, 1992; MAIER & KNIGHT, 1993; ALAIMO *ET AL.*, 1994; BENDELL-YOUNG *ET AL.*, 1994; BERVOETS *ET AL.*, 1994; POSTMA *ET AL.*, 1996; HARRAHY & CLEMENTS, 1997; GROENENDIJK *ET AL.*, 1999).

- Estudios toxicológicos. Bajo este título quedarían englobadas todas aquellas investigaciones que tratan de relacionar el efecto de diversos agentes estresantes con respuestas biológicas cuantificables en los organismos, incluidos los ensayos de laboratorio en los que se efectúan tests de toxicidad; que han adquirido gran importancia en estos últimos años gracias al perfeccionamiento de los protocolos de laboratorio, así como a la adopción de dichos métodos por parte de la administración de numerosos países para el control de los efectos de sustancias contaminantes. La tasa de mortalidad de los organismos, normalmente expresada como LC₅₀ (concentración letal de la sustancia para el 50% de los organismos del test) en 24 o 48 horas es una de las respuestas biológicas más empleadas en este tipo de pruebas.

Las larvas de quironómidos, debido tanto a las características de su ciclo vital como a su modo de vida y la facilidad para su cultivo en el laboratorio, han sido utilizadas frecuentemente en este tipo de estudios (ver revisión en TRAUNSPURGER & DREWS, 1996), y se ha recomendado su uso para estos fines (ANDERSON, 1980; SETAC, 1993).

- Abundancia y diversidad de especies y estructura de la comunidad. El punto de partida del uso de los quironómidos como herramienta de evaluación ambiental, lo constituye el trabajo de THIENEMANN (1922), que utilizó las larvas de esta familia para establecer una clasificación

de los lagos según su estado trófico. Posteriormente, autores como SAETHER (1979), WIEDERHOLM (1980) o KANSANEN *ET AL.* (1984) han perfeccionado su uso y demostrado su idoneidad para ese fin. Por ejemplo LINDEGAARD (1992), en un exhaustivo trabajo realizado en el lago Thingvallavatn, en Islandia, discute los resultados obtenidos para la fauna de macroinvertebrados (principalmente quironómidos y tubificidos) con las clasificaciones establecidas por SAETHER (1979) y WIEDERHOLM (1980) y, aunque confirma su validez, añade que fenómenos de aislamiento zoogeográfico provocan desajustes respecto a las clasificaciones citadas.

Las comunidades de larvas de quironómidos también han sido empleadas para obtener información sobre contaminación de cursos de agua dulce (ROSENBERG & WIENS, 1976; SERRA-TOSIO, 1977; WINNER *ET AL.*, 1980; LENAT, 1983; BAZZANTI & BAMBACIGNO, 1987; KAWAI *ET AL.*, 1989; KOWNACKI, 1989), al igual que las exuvias pupales (WILSON & BRIGHT, 1973; MCGILL *ET AL.*, 1979; WILSON, 1980; LAVILLE & VIAUD-CHAUVET, 1985; BAZERQUE *ET AL.*, 1989; COBO & GONZÁLEZ, 1991).

El estudio de exuvias presenta menos dificultades que las larvas para su identificación, y además el método de recolección permite obtener ejemplares residentes en todo tipo de microhábitats, sin embargo tiene la desventaja de que la composición de las muestras puede variar enormemente a lo largo del año debido a los fenómenos de emergencias sincrónicas (MCGILL *ET AL.*, 1979).

- Respuestas biológicas subletales. En la mayoría de los estudios abordados en los epígrafes anteriores, el estrés al que están sometidos los organismos es detectado cuando el agente estresante ha provocado ya la desaparición de algunos individuos o incluso poblaciones. Desde hace algunas décadas se viene insistiendo en la necesidad de desarrollar y perfeccionar métodos que permitan la detección de dicho estrés antes de que éste pueda afectar seriamente a las poblaciones (LEARY & ALLENDORF, 1989; CLARKE, 1994; 1995; VERMEULEN, 1995).

Los estudios de toxicidad en laboratorio han ido incorporando diversas

respuestas subletales, entre las que podemos citar distintos criterios de desarrollo tales como, las tasas de crecimiento, maduración sexual y emergencia de adultos. También se han utilizado con este fin ciertas alteraciones etológicas y morfológicas, como cambios en el comportamiento, el estudio de deformidades o el análisis de asimetría fluctuante (BARCA *ET AL.*, 2008).

Con el desarrollo de la Biología molecular han surgido nuevas formas de detección de respuestas subletales, se han llevado a cabo estudios sobre marcadores bioquímicos y fisiológicos entre los que se encuentran el estudio de tasas de respiración, medidas de alteraciones en el metabolismo, medidas de actividad enzimática, concentración de distintas macromoléculas, etc. Estos indicadores, han sido utilizados también como índices del estado fisiológico de los organismos durante los diferentes periodos de crecimiento (BEHANAN & MATHEW, 2004) y como indicadores de su condición nutricional (CHÍCHARO & CHÍCHARO, 1995). El estudio del estado nutricional de los organismos permite evaluar individualmente el estado fisiológico de un individuo, que refleja las condiciones ambientales a las que ha sido expuesto.

FERRON & LEGGETT (1994) han clasificado el estudio de la condición nutricional en tres categorías de acuerdo con el nivel de organización sobre el que se trabaja, estos son: nivel de organismo, nivel tisular y nivel celular.

A nivel de organismo, el interés está enfocado en detectar cambios en la forma externa del cuerpo que se relacionan con la condición nutricional. Estos cambios son usualmente estudiados empleando técnicas morfométricas debido a su carácter integrador y los resultados son expresados como tasas o vectores multivariados de las mediciones realizadas sobre el cuerpo. Sin embargo, estos índices han sido criticados por su baja sensibilidad a los procesos a corto plazo.

A nivel tisular, los cambios en la condición son detectados a través de las modificaciones en la apariencia de las células en diferentes tejidos del animal. Una ventaja fundamental de estos índices es que el patrón

general de la degradación tisular es relativamente independiente del tamaño del individuo y, hasta cierto punto, de la especie (FERRON & LEGGETT, 1994; GRIOCHE, 1998). Una de las principales críticas que recibe esta metodología tiene que ver con la falta de objetividad en el diagnóstico de los tejidos.

A nivel celular se emplean índices bioquímicos. La condición bioquímica puede ser evaluada por la cuantificación de constituyentes celulares utilizados como fuente de energía o indicadores de tasas fisiológicas que se sabe varían en función de la condición del animal (FERRON & LEGGETT, 1994; HERRERO *ET AL.*, 2016). La determinación química de la condición nutricional ha sido ampliamente utilizada en los últimos años debido al progresivo avance de las técnicas empleadas.

Muchas de estas respuestas subletales han sido estudiadas con profusión en quironómidos. Así, existen trabajos que hacen referencia a alteraciones del desarrollo y ciclo vital (ANDERSON *ET AL.*, 1980; KOSALWAT & KNIGHT, 1987; MCCAHON & PASCOE, 1991; POSTMA *ET AL.*, 1994; 1995; POSTMA & DAVIDS, 1995; STUIJFZAND *ET AL.*, 1996; 1998; WATTS & PASCOE, 1996; BENOIT *ET AL.*, 1997; SIBLEY *ET AL.*, 1997), alteraciones del comportamiento (HEINIS & SWAIN, 1986; HEINIS *ET AL.*, 1990; ZANDT *ET AL.*, 1994; GERHARDT & JANSSENS DE BISTHOVEN, 1995; SIBLEY *ET AL.*, 1998) y alteraciones a nivel infraespecífico (anomalías morfológicas e indicadores metabólicos) (THORNTON & WILHM, 1974; FRANK, 1981; DARVILLE *ET AL.*, 1983; HAMBURGER *ET AL.*, 1995; ORTEL 1996; BARATA & BAIRTD, 2000; HIRTHE *ET AL.*, 2001; SERVIA 2001; ANSALDO *ET AL.*, 2006; SERVIA *ET AL.*, 2006 A; 2006 B; SÁNCHEZ-ARGÜELLO *ET AL.*, 2009).

3.3. FUNDAMENTO DE LA UTILIZACIÓN DE LOS BIOMARCADORES

3.3.1. Base teórica

Según LAGADIC *ET AL.* (1997), un biomarcador es un cambio observable o medible a nivel molecular, bioquímico, celular, fisiológico o comportamental que revela la exposición presente o pasada de un individuo a, al menos, una sustancia química con carácter contaminante.



Figura 7. Esquema en que se relacionan los distintos tipos de herramientas de evaluación ambiental con los distintos niveles de organización biológica. Modificado de AMIARD (1994).

La evaluación ambiental basada en la presencia y abundancia de especies bioindicadoras tiene como fundamento teórico que el estado de ciertas poblaciones es de alguna forma extrapolable a las comunidades y ecosistemas a los que pertenecen. Si consideramos que los biomarcadores nos proporcionan información fiable sobre el estrés al que está sometido

un individuo o grupo de individuos pertenecientes a una especie bioindicadora, adecuando el tamaño muestral podemos conocer el estado de la población a la que pertenece; y por consiguiente el de la comunidad y ecosistema del que forma parte dicha población (figura 7).

De este modo muchas especies que no son consideradas clásicamente como bioindicadoras pueden ser fiables en estudios que utilicen biomarcadores y aportar información precisa sobre el efecto subletal de algunas perturbaciones.

Tal y como se muestra en la figura 8, DEPLEDGE *ET AL.* (1993) definen distintas fases de la progresión del estado fisiológico de un organismo expuesto a un contaminante -desde el estado óptimo, hasta la enfermedad y muerte- y las asocian con hipotéticas respuestas de biomarcadores (B1-B4) asociadas a cambios en la condición fisiológica.

DEPLEDGE & FOSSI (1994) proponen una secuencia de tres fases para una correcta evaluación ambiental, contemplando dos aspectos bien diferenciados; la evaluación del estado actual del ecosistema y la predicción del futuro estado ecológico:

La primera fase, identificación del ecosistema en riesgo, consiste en la caracterización tanto del ecosistema como de las alteraciones y presiones a las que se ve sometido. Para ello han de utilizarse diversos métodos específicos para cada ecosistema, que incluirían desde técnicas analíticas clásicas hasta biomarcadores genéricos, pasando por índices biológicos convencionales (índices de diversidad, abundancia, especies indicadoras...), ya que todos son complementarios y necesarios para una mejor y más completa evaluación preliminar.

La segunda fase consistiría en la identificación de las especies críticas y poblaciones objetivo. Es técnicamente imposible analizar todos los componentes de un ecosistema, por eso, en esta fase se seleccionan las poblaciones que serán sometidas al análisis mediante el uso de biomarcadores, para ello se tomarán especies de diferentes nichos ecológicos y en la medida de lo posible, de diferentes grupos taxonómicos.

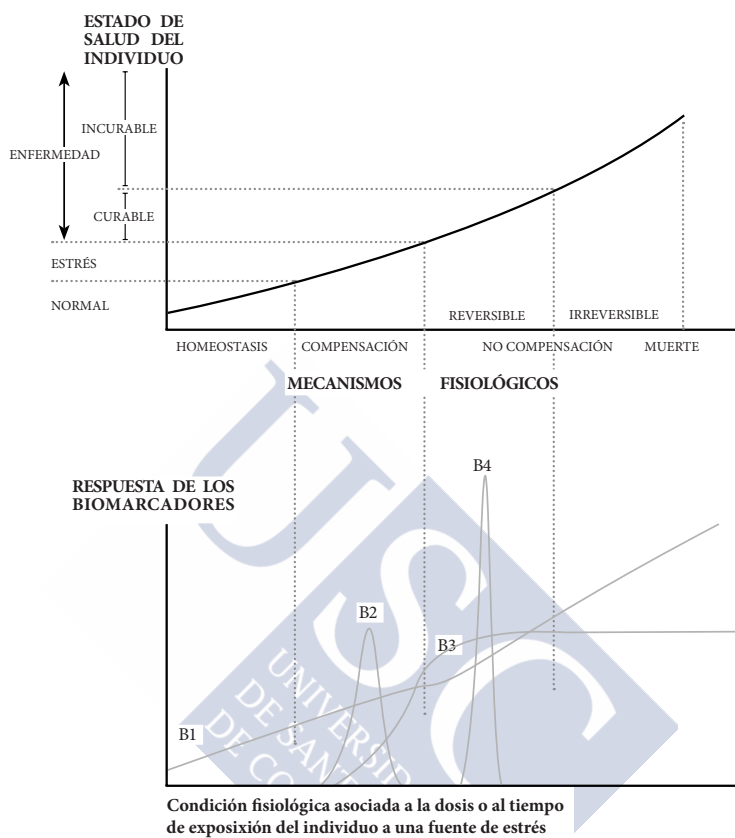


Figura 8. En la primera grafica se observa la posible evolución del estado fisiológico de un organismo expuesto a un contaminante, desde el estado óptimo, hasta la enfermedad y muerte. En la segunda gráfica aparecen diferentes hipotéticas respuestas de biomarcadores (B1-B4) asociadas a cambios en la condición fisiológica. Modificado de DEPLEDGE ET AL. (1993), en JOUBERT, (2000).

La última fase, predicción del impacto potencial de contaminantes químicos, combina ensayos de laboratorio con estudios de campo para el establecimiento de una base científica firme que permita extrapolar los datos obtenidos en el laboratorio a entornos naturales.

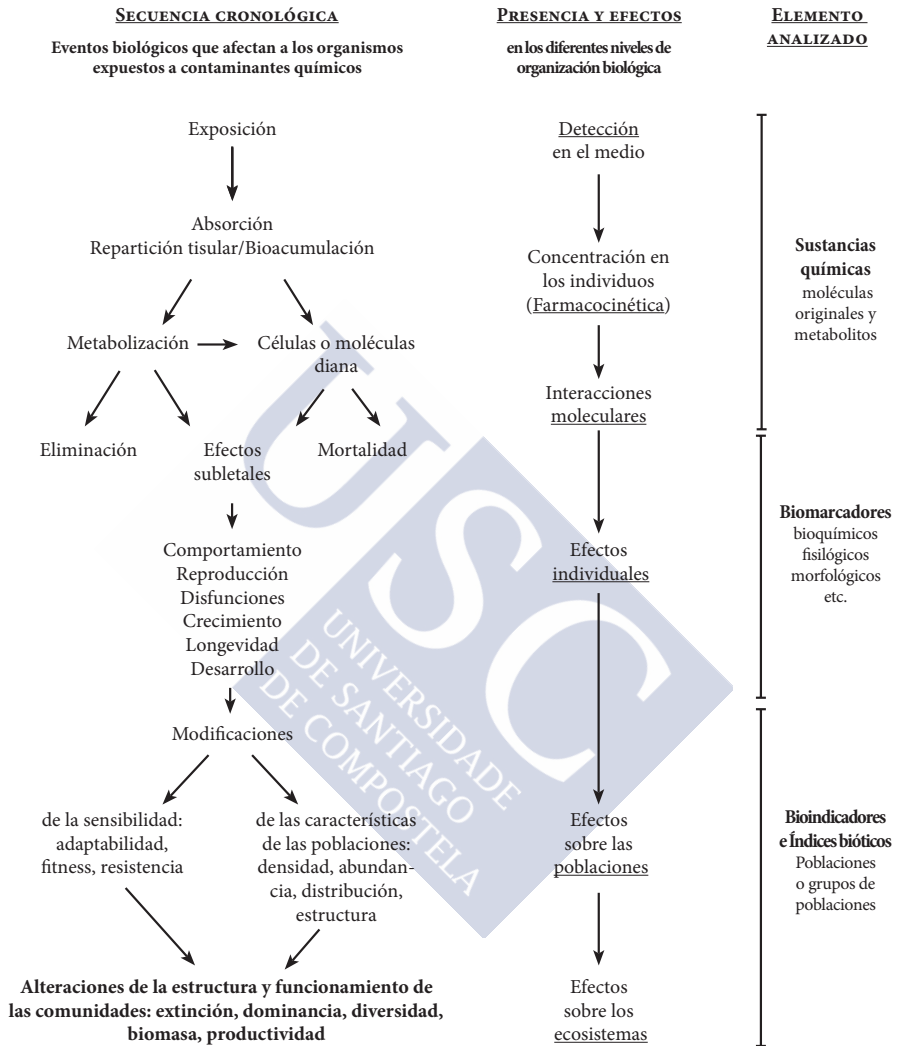
De aplicarse el uso de biomarcadores a través de este u otros métodos deben ser seleccionadas adecuadamente tanto las poblaciones fuente, como los biomarcadores utilizados. La elección debe hacerse en función de los objetivos del trabajo, cuando se trata de averiguar cuál es la sustancia causante de un episodio de contaminación, lo más adecuado es utilizar marcadores bioquímicos específicos (actividad enzimática, metalotioneínas...). Sin embargo si lo que se desea es obtener una visión general del estado lo más adecuado será emplear biomarcadores no específicos o indicadores metabólicos, ya que responden ante diferentes tipos de estrés y pueden reflejar verazmente los efectos de la exposición sobre estado metabólico o de reserva energética del organismo.

Así, cualquier parámetro medible que pueda dar una idea del estado fisiológico general de un organismo es susceptible de ser utilizada como un indicador metabólico. Algunos ejemplos de eficacia contrastada, además de los tres sometidos a estudio en esta tesis, serían: los niveles de lípidos, la relación RNA/proteínas, la relación C/N, la relación RNA/proteínas, la relación P/C, etc. (GWAK & TANAKA, 2002; OKUMURA *ET AL.*, 2002; VREDE *ET AL.*, 2002; ROSA & NUNES, 2004).

3.3.2. Ventajas y limitaciones

Las principales ventajas del uso de biomarcadores frente a los métodos biológicos tradicionales para la evaluación de impacto ecológico son :

- Rápida respuesta al agente estresante, mientras que la observación de efectos a niveles superiores de organización puede requerir un período más o menos largo de latencia. Esta velocidad de reacción proporciona una alerta temprana que permite detectar cambios potenciales en el ecosistema antes de que se produzcan (figura 9) (DEPLEDGE & FOSSI, 1994).



BIOMARCADORES COMO HERRAMIENTA PARA LA MEDIDA DEL ESTRÉS AMBIENTAL

Figura 9. Esquema de la cronología teórica de los efectos inducidos por un contaminante introducido en el medio natural. Modificado de LAGADIC ET AL. (1997).

- Frente a los métodos físicoquímicos, según DEPLEDGE & FOSSI (1994) y LAGADIC *ET AL.* (1997), la utilización de biomarcadores, en casos de contaminación química, proporciona la ventaja de detectar alteraciones no sólo en términos de presencia, sino que permite conocer los efectos que estos contaminantes producen sobre los individuos.
- En comparación con los métodos que cuantifican la bioacumulación el uso de biomarcadores permite detectar la exposición a compuestos que, como los organofosforados o los carbamatos, son rápidamente metabolizados y apenas se acumulan en el organismo (LIVINGSTONE, 1993; LAGADIC *ET AL.*, 1997).
- Complementando el uso de biomarcadores con resultados de estudios previos de laboratorio, se pueden asociar las medidas de exposición al agente estresante con sus efectos individuales, poblacionales e incluso ecológicos. O dicho de otra forma, se puede determinar cualitativa y cuantitativamente la exposición sufrida por los organismos.
- Otra ventaja de los biomarcadores es que no solo proporcionan información acerca de los contaminantes originales, sino también de sus productos de degradación, que dan lugar a metabolitos más biodisponibles y potencialmente más peligrosos que los contaminantes originales (LAGADIC *ET AL.*, 1997).
- Además ofrecen cierta información sobre la distribución de los contaminantes en el medio. En función de su hábitat y de su posición en la cadena trófica, las especies fuente de biomarcadores pueden proporcionar información sobre la manera en la que los contaminantes se diluyen en el medio, o se concentran en ciertos compartimentos del ecosistema (LAGADIC *ET AL.* 1997).
- Por último, los biomarcadores suministran información integrada de las interacciones farmacocinéticas y toxicológicas resultantes de la exposición de los organismos a mezclas complejas de contaminantes y los cambios en las tasas de absorción con respecto al tiempo (DEPLEDGE & FOSSI, 1994; HANDY *ET AL.*, 2003)

En cuanto a los límites de la técnica debemos señalar que la mayoría los impone la falta de estudios a largo plazo, tanto de campo como de laboratorio. Por esta razón, se están desarrollando cada vez más estudios exhaustivos a largo plazo, bajo condiciones controladas que ya están teniendo las siguientes consecuencias directas:

- Un mayor conocimiento de la farmacocinética y de la acción de los tóxicos, incluyendo las rutas de absorción, interacción y detoxificación de cada tóxico y en cada especie.
- Una mejor y más fidedigna interpretación de la significación biológica de los biomarcadores a nivel de efectos toxicológicos y ecotoxicológicos. Profundizando en aspectos como el tiempo durante el cual es perceptible la variación de un biomarcador o las rutas bioquímicas relacionadas con él, se podrá determinar qué implicaciones metabólicas indirectas podremos esperar con su variación. De este modo, la interpretación de los resultados con respecto a niveles superiores de organización se verá también positivamente afectada.
- Un conocimiento profundo de las relaciones dosis-respuesta en un mayor número de organismos y de agentes estresantes, lo que permitiría una mayor precisión en la identificación y, sobre todo, en la determinación de la intensidad del agente estresante.
- Una mayor eficiencia de las técnicas analíticas, que conllevaría una optimización del método (mayor precisión y exactitud) y de los recursos (protocolos más rápidos y económicos).

Otro aspecto a tener en cuenta y quizás el más difícil de soslayar, es distinguir entre variaciones producidas por estrés antrópico y el ruido de fondo que constituyen las fluctuaciones naturales de los biomarcadores. Para conseguir solventar este obstáculo, es necesaria la ampliación de conocimientos sobre cuáles son los factores en la variación natural de los biomarcadores y en qué grado lo hacen.

Según HANDY *ET AL.* (2003) estos factores de variación se pueden clasificar en geoquímicos (temperatura, salinidad, concentración de oxígeno, pH,

condiciones climáticas y meteorológicas, características fisicoquímicas del medio, etc.) o bióticos (sexo, edad, estación, estado reproductivo, grado de tolerancia a distintas fuentes de estrés, plasticidad fenotípica, genotipo poblacional, relaciones intra o interespecíficas, etc.).

Tal y como se ha mencionado, esta es una cuestión compleja, ya que los ecosistemas son heterogéneos incluso a muy pequeña escala, y son muchos los factores que influyen en la variación de los biomarcadores (DEPLEDGE & FOSSI, 1994; LAGADIC *ET AL.* 1997; CHOI, 1998).



3.4. BIOMARCADORES METABÓLICOS

3.4.1. Concentración tisular de glucógeno como biomarcador.

El paso previo para una correcta interpretación de los datos procedentes de cualquier tipo de biomarcador es el estudio de los factores fuente de variación de la molécula en cuestión y de la fisiología de la especie sometida a estudio, así como de los niveles de referencia de cada biomarcador (MEYER, 1990; BRIEGEL, 2003).

En el caso del glucógeno son muchos los factores que influyen en su concentración en el seno de los organismos, ya que este polisacárido constituye, en la gran mayoría de los metazoos, la principal reserva energética de rápida movilización. Varios investigadores han tratado de dilucidar cuales son las fuentes de variación principales (naturales y antrópicas) y de qué forma influyen sobre las reservas de esta molécula en distintos tipos de animales.

TIMMERMAN & BRIEGEL (1999) hallaron una correlación lineal entre tamaño corporal y niveles de glucógeno en dípteros de las subfamilias *Culicinae* y *Anophelinae*. En concordancia, CAVALETTO *ET AL.* (2003) afirman que en ciertos efemerópteros del género *Hexagenia* los niveles de glucógeno varían en función de la cantidad de alimento potencial disponible.

Uno de los factores naturales más influyentes es el ciclo reproductivo, que normalmente está sincronizado con las condiciones climatológicas del área de distribución de la especie. DUTRA *ET AL.* (2007; 2008) determinaron las variaciones estacionales de glucógeno en varias especies de crustáceos de agua dulce. Estos autores señalan como fuentes principales de variación estacional: el estatus reproductivo y la disponibilidad de alimento.

También BARCA (2015) en el agnato *Petromyzon marinus* observó que los niveles de glucógeno sufren variaciones sincronizadas con la migración reproductivas. GALAP *ET AL.* (1997) hayaron también dichas diferencias

asociadas al ciclo reproductivo en el bivalvo marino *Glycymeris glycymeris*, mostrando siempre niveles máximos entre dos y tres meses antes de la época reproductiva.

Otro factor relevante, en lo que a reservas de glucógeno se refiere, es la fase del desarrollo larvario, sobre todo en insectos holometábolos, ya que la metamorfosis posterior a la pupación supone una gran demanda de glucógeno, imprescindible para que el proceso de emergencia tenga lugar (HAMBURGUER ET AL., 1996).

Esto se ve reforzado por el hecho de que, durante los periodos de muda y metamorfosis los animales ayunen y consuman energía procedente de las reservas asimiladas durante el periodo de alimentación previo (SIEGERT ET AL., 1987). Esto ha sido comprobado en diferentes grupos de insectos: en efemerópteros del género *Hexagenia* por CAVALETTO ET AL. (2003); en el lepidóptero *Manduca sexta* por SIEGERT ET AL. (1987); en especies de los géneros de dípteros *Culex* y *Aedes* por VAN HANDEL (1988), y en una de las especies objeto de este trabajo, *C. riparius*, por SERVIA ET AL. (2006 B). En este último los autores determinaron que la fase de desarrollo larvario es más relevante que el sexo sobre las reservas de glucógeno. También HAMBURGER ET AL. (1996) coinciden en este aspecto, categorizando los niveles de glucógeno como factor clave para el inicio de los periodos de muda y metamorfosis en *Chironomus anthracinus*.

Se ha demostrado que la diapausa influye sobre la acumulación de reservas de glucógeno en algunos insectos. WIPKING ET AL. (1994) y GODDEERIS ET AL. (2001), en sus trabajos con *Zygaena trifolii* y *Chironomus riparius* respectivamente, coinciden en que los individuos que pasan por un estado de diapausa acumulan normalmente una mayor cantidad de reservas y alcanzan un mayor tamaño que los que no la sufren. Esto se debe a que durante el periodo de diapausa las larvas detienen su desarrollo, pero, a pesar de que disminuyen significativamente su actividad, continúan ingiriendo alimento y almacenando reservas durante más tiempo.

KOOP ET AL. (2008) observó que las reservas de glucógeno de tres especies distintas de macroinvertebrados fluviales, se relacionaban estrechamente

con la zona del río donde habían sido recogidos, de modo que a medida que se alejaba del hábitat óptimo de cada organismo, sus reservas de glucógeno disminuían. En este caso el contenido del glucógeno actúa como indicador de bondad del hábitat y engloba todos aquellos factores bióticos y abióticos que afectan a cada una de las especies de forma particular.

Dentro de factores naturales fuente de variación de los niveles de glucógeno, también se incluyen ciertos tipos de agentes estresantes de origen no antrópico como la competencia intra e interespecífica, el ayuno, las condiciones hipóxicas, etc. Estas fuentes de estrés existen en los ecosistemas de forma natural, aunque en algunos casos se ven potenciadas e intensificadas por el hombre.

Uno de los agentes estresantes que está presente en los ecosistemas acuáticos de forma natural es la hipoxia. La falta de oxígeno suele tener dos consecuencias directas en los animales que se ven sometidos a ella: la inducción del ayuno (cesa la incorporación de reservas en energéticas y se consumen las existentes), y el paso del metabolismo aeróbico al anaeróbico, que es menos eficiente y que no degrada completamente los sustratos energéticos (HAMBURGUER *ET AL.*, 1993; 1995; 1996, 2000).

Según HOBACK & STANLEY, (2001) el glucógeno es el sustrato metabólico primario en el metabolismo anaeróbico de los quironómidos. Por todo esto y a pesar de que durante el periodo de hipoxia los animales suelen reducir su metabolismo al mínimo, se puede concluir que en condiciones de falta o escasez de oxígeno los organismos sufren una importante reducción en sus reservas de glucógeno.

Esto ha sido estudiado profusamente en quironómidos por REDECKER & ZEBE (1988) y HAMBURGUER *ET AL.* (1994, 1995, 1996, 2000) combinando este último, en su trabajo de 1995, dichas condiciones de hipoxia con los efectos concomitantes de la contaminación térmica, que disminuye la solubilidad del oxígeno y eleva el metabolismo basal incrementando la demanda energética.

Con el estrés de origen exclusivamente antrópico han sido publicados numerosos trabajos acerca de la reducción de los niveles de glucógeno en

presencia de distintos contaminantes químicos (metales pesados, elementos traza, pesticidas, fungicidas, herbicidas, disruptores hormonales, etc.) y en distintos grupos animales acuáticos como: teleósteos, crustáceos, moluscos, insectos y también en *Chironomus riparius* (tabla 1).

Sea de origen antrópico o no, mayoritariamente se acepta que el estrés produce un gasto de energía adicional que normalmente se traduce en una disminución en las reservas de glucógeno. Este gasto energético es debido a distintas causas según el tipo de estrés.

Tabla 1. Algunos trabajos científicos sobre el glucógeno y su relación con el estrés ambiental.

Organismo	Tipo de estrés	Referencia
ANELIDOS		
<i>Potamothenis hammoniensis</i>	Hipoxia	HAMBURGER ET AL., 2000
MOLUSCOS		
<i>Biomphalaria glabrata</i>	As, Cd, Pb	ANSALDO ET AL., 2006
<i>Lymnaea palustris</i>	Atrazina y hexaclorobenceno (HCB)	BARUTO ET AL., 1995
<i>Pisidium subtruncatum</i>	Hipoxia	HAMBURGER ET AL., 2000
<i>Pisidium casertanum</i>	Hipoxia	HAMBURGER ET AL., 2000
<i>Turbo cornutus</i>	Ayuno	OKUMURA ET AL., 2002
CRUSTACEOS		
<i>Daphnia magna</i>	Metales y compuestos químicos	DE COEN & JANSSEN, 2003 A
	Compuestos químicos	DE COEN & JANSSEN, 2003 B
	Tetradifon	VILLARROEL ET AL., 2009
	Tebuconazol	SANCHO ET AL. 2009
<i>Oniscus asellus</i>	Metales	SCHILL, 2004
<i>Porcellio scaber</i>	Metales	SCHILL, 2004

Tabla 1 (Continuación).

Organismo	Tipo de estrés	Referencia
INSECTOS		
Lepidópteros		
<i>Bombyx mori</i>	Insecticidas organofosforados	NATH, 2002
<i>Lymantria dispar</i>	Metales pesados	BISCHOF, 1995; ORTEL, 1996
Dípteros		
<i>Chironomus anthracinus</i>	Temperatura	HAMBURGER ET AL., 1994
	Hipoxia	HAMBURGER ET AL., 1994; 1995; 1996; 2000
<i>Chironomus riparius</i>	Dicromato de Potasio y fenotrotion	CHOI, 1998; CHOI ET AL., 2001
	Hipoxia e hiperoxia	CHOI, ET AL., 2001
	Cu	SERVIA ET AL., 2006 A
OSTEÍCTIOS		
<i>Carassius auratus</i>	Contaminación industrial	PALERMO ET AL., 2008
<i>Cyprinus carpio</i>	Cd	CICK & ENGIN, 2005
<i>Danio rerio</i>	Contaminación industrial	SMOLDERS ET AL., 2003
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Metales	PEPLOW & EDMONDS, 2005
<i>Salmo trutta</i>	Contaminación orgánica (urbana)	COBO ET AL., 2013
<i>Pogonichthys macrolepidotus</i>	Organoclorados y Metales traza	GREENFIELD ET AL., 2008

La hipótesis más aceptada para explicar la mencionada reducción postula que, bajo una situación de estrés químico, los organismos, normalmente, y dependiendo de la dosis contaminante, cesan o disminuyen la actividad alimentaria, reduciendo así la incorporación de tóxicos, y gastan grandes cantidades de energía en procesos de detoxificación y compensación fisiológica (CHOI, 1998).

Basándose en estudios realizados en coleópteros terrestres, MARYAŃSKI *ET AL.*, (2002) aseveran que cuando existe detoxificación activa se produce un descenso en las reservas y que por este motivo los organismos han de limitar su gasto energético. Dicha limitación del gasto energético se lleva a cabo redistribuyendo las reservas y economizando en facetas como la resistencia a otros agentes estresantes, el peso corporal o la longevidad, tendiendo a mantener su vida reproductiva constante para intentar minimizar los efectos negativos sobre su *fitness*.

Ciertos agentes contaminantes provocan, además del estrés tóxico, un descenso en la disponibilidad de oxígeno. En estos casos los efectos de ambos tipos de estrés actúan de forma sinérgica sobre los niveles de reservas energéticas y por ende los de glucógeno, mermándolos significativamente. Del mismo modo, algunos tóxicos afectan directamente a enzimas digestivas reduciendo la eficiencia de la digestión y de la asimilación del, probablemente poco, alimento ingerido con la consecuente suma de efectos negativos sobre las reservas de glucógeno (DE COEN & JANSSEN, 1998).

Existen algunas excepciones a la afirmación de que el estrés afecta negativamente a los niveles de glucógeno; casos en los que la exposición a ciertos tipos de agentes contaminantes no producen ningún cambio o incluso un ligero aumento en las reservas de glucógeno. Este fenómeno se ha explicado a través de diferentes hipótesis. PELOW & EDMONDS (2005) observaron que en truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) expuestas permanentemente a metales, en lugar reducirse sus reservas hepáticas de glucógeno, éstas eran superiores a las de individuos no expuestos. Los autores concluyeron que era debido a una patología causada por el cobre llamada GSD IV (desorden de almacenamiento de glucógeno tipo IV), que consiste en la síntesis de una molécula anormal de glucógeno insoluble que se acumula en forma de inclusiones en el hígado y que no vuelve a ser transformado en glucosa; imposibilitando su distribución a otros tejidos.

Para Maryaski *ET AL.* (2002) el estrés químico no siempre es compensado mediante detoxificación activa, aunque la mayoría de trabajos existentes así lo confirmen. En ese caso las reservas energéticas se mantienen constantes pero la esperanza de vida de los individuos cae drásticamente. Estos

mismos autores proponen la hipótesis de la adaptación de las poblaciones sometidas permanentemente a algún tóxico puede tener como resultado una población tolerante al agente estresante soportado. Dicha población no mostraría disminuciones en sus niveles de reservas energéticas pero su fitness decrecería enormemente fuera de la zona de influencia del tóxico en cuestión.

Se ha demostrado que la exposición de larvas de *Chironomus riparius* a dosis relativamente bajas de Cu produce pequeños aumentos en los niveles de glucógeno (SERVIA ET AL., 2006 A). Podemos encontrar una explicación para este fenómeno en el trabajo de ORTEL (1996), quien formula dos posibles hipótesis para los altos niveles de glucógeno tisular obtenidos en individuos del lepidóptero *Lymantria dispar* expuestos a bajas concentraciones de cadmio, plomo y cobre. La primera de ellas es un fenómeno conocido como hormesis, por el cual, pequeñas dosis de tóxicos pueden tener efectos beneficiosos para los organismos expuestos. La otra es la posible interferencia de los metales mencionados con enzimas relacionadas con el metabolismo del glucógeno, concretamente, con la glucogenolisis.

Otro caso es el expuesto por STUIJFZAND *et al.* (2000) en el que en un ambiente contaminado por metales pesados y con una elevada carga orgánica, las larvas de *C. riparius* no mostraban ningún descenso en sus niveles de glucógeno. Lo mismo ocurrió con las truchas comunes (*Salmo trutta* estudiadas por COBO ET AL. (2013). Las explicaciones argumentadas por los autores sostienen que, o bien la contaminación por metales era suficientemente baja como para que se compensase con los efectos positivos de la abundancia de alimento, o bien las partículas de materia orgánica ejercen algún efecto de neutralización o reducción de la biodisponibilidad de los agentes tóxicos.

3.4.2. Concentración tisular de proteínas como biomarcador

El contenido en proteínas refleja fielmente el estatus fisiológico de un organismo y es una buena medida de sus reservas energéticas (VILLARROEL *ET AL.*, 2009). La validez de este parámetro como biomarcador depende, como ya se ha mencionado, del conocimiento previo de los niveles normales en cada especie y sus fluctuaciones debidas a factores naturales (DEPLEDGE & FOSSI, 1994; LAGADIC *ET AL.*, 1997; CHOI, 1998; BARCA, 2015).

Siguiendo esa línea, se han realizado trabajos que relacionan la concentración de proteínas con el desarrollo ontogénico en el pez pleuronectiforme *Paralichthys olivaceus* (GWAK & TANAKA, 2002) en el agnato *Petromyzon marinus* (BARCA, 2015; SILVA *ET AL.*, 2016) y en larvas de dípteros de la subfamilias *Anophelinae* y *Culicinae* (VAN HANDEL, 1988; TIMMERMAN & BRIEGEL, 1999). Todos los resultados obtenidos muestran un incremento más o menos lineal de la cantidad de proteínas durante el desarrollo, hasta llegar a las fases previas a la metamorfosis, en las que se produce un aumento más pronunciado. En la etapa postmetamórfica los niveles de proteínas de *Paralichthys olivaceus* decrecen drásticamente (GWAK & TANAKA, 2002).

Por el contrario, en ninfas macho del efemeróptero *Epeorus sylvicola* los niveles de proteínas descienden, en favor de la síntesis del cuerpo graso, a medida que se aproximan al estado de subimago. En las hembras sucede lo contrario, ya que la oogénesis requiere unas altas tasas de síntesis proteica. De esta forma se pone de manifiesto la influencia, en algunas especies, del sexo de los individuos sobre las variaciones en los niveles proteicos (MEYER, 1990).

Normalmente las variaciones de las condiciones ambientales (bióticas y abióticas), dependientes principalmente de la climatología regional, suelen ser determinantes en los ciclos vitales y reproductivos de las especies (CHOE *ET AL.*, 2008). Estos ciclos condicionan todos los aspectos de la biología de los animales, entre ellos la fisiología. Debido a esto, los niveles de proteínas

fluctúan a lo largo del año en función de la época reproductora y los ciclos vitales.

Lo más habitual es un incremento de los niveles proteicos previo a la reproducción, más notorio en las hembras por la alta composición en proteínas del huevo. Este patrón ha sido corroborado por ROSA & NUNES (2003), SILVA-CASTIGLIONI *ET AL.* (2007) y DUTRA *ET AL.* (2007; 2008) en crustáceos; por GALAP *ET AL.* (1997) en bivalvos y por CHOE *ET AL.* (2008) en el quetognato *Parasagitta elegans*.

KOOP *ET AL.*, (2008) integraron todas las características que componen el hábitat fluvial bajo un mismo factor: el curso del río; observando cómo varían, en función de este factor, los niveles de proteínas en tres especies de invertebrados dulceacuícolas, concluyeron que la compensación de condiciones desfavorables requiere energía metabólica adicional que eventualmente es suministrada por las reservas proteicas.

En la inmensa mayoría de los estudios realizados sobre la relación entre la concentración de proteínas y estrés ambiental (natural o antrópico) se confirma la hipótesis de que el estrés reduce significativamente la concentración de proteínas, ya sea en fluidos corporales, músculo, tegumento u otros tejidos. Esto puede ser explicado por el hecho de que un animal en condiciones óptimas dedica gran parte de sus recursos moleculares y energéticos al crecimiento, y por ende al anabolismo de proteínas de todo tipo (estructurales, enzimas, hormonas, etc.); pero, cuando se ve sometido a estrés, debe invertir estos recursos en la compensación de dicho estrés. De manera que, una reducción en el contenido proteico indica que las proteínas tisulares están sometidas a proteólisis que resulta en la producción de aminoácidos, utilizados principalmente para la producción de energía durante las condiciones de estrés (SANCHO *ET AL.*, 2009; VILLARROEL *ET AL.*, 2009).

En la tabla 2 se muestran algunos ejemplos de investigaciones, realizadas en distintos grupos de animales acuáticos, relacionadas con la influencia de distintos tipos de estrés en la concentración de proteínas.

Tabla 2. Algunos estudios realizados sobre la relación de la concentración de proteínas totales con el estrés ambiental.

Organismo	Tipo de estrés	Referencia
ANÉLIDOS		
<i>Lumbriculus terrestris</i>	Isoproturón	MOSLEH ET AL., 2002
CRUSTÁCEOS		
<i>Daphnia magna</i>	Tetradifon	VILLARROEL ET AL., 2009
	Tebuconazol	SANCHO ET AL. 2009
	Cr y Cd	JEMEC ET AL., 2008
	Residuos industriales y urbanos	DAMÁSIO ET AL., 2008
INSECTOS		
Dípteros		
<i>Chironomus riparius</i>	Cd	CHOI & HA, 2009
	Dicromato de Potasio, fenotrotion, hipoxia e hiperoxia	CHOI ET AL., 2001
OSTEÍCTIOS		
<i>Catla catla</i>	Residuos procedentes de acuicultura	MUKHERJEE & JANA, 2007
	Cd y Zn	REYMLA ET AL., 2008
<i>Ciprinus carpio</i>	Cr, Ni	VIRK & KAUR, 1999
<i>Labeo rohita</i>	Residuos procedentes de acuicultura	MUKHERJEE & JANA, 2007
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ayuno	WEBER ET AL., 2003; CONGLETON & WAGNER, 2006
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Ayuno	CONGLETON & WAGNER, 2006
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Residuos procedentes de acuicultura	MUKHERJEE & JANA, 2007
<i>Pimephales promelas</i>	Ayuno	WEBER ET AL., 2003
<i>Solea senegalensis</i>	Cu	FONSECA ET AL., 2009

En casi todos ellos se confirma una reducción significativa en el contenido en proteínas asociada al estrés, salvo en los trabajos de MUKHERJEE & JANA (2007), FONSECA *ET AL.* (2009) y CHOI *ET AL.* (2001). En los dos primeros no se observó variación alguna con respecto a los valores de individuos no expuestos al agente estresante. En el trabajo de CHOI *ET AL.* (2001) se confirma un incremento significativo en los niveles de proteínas totales en *C. riparius* bajo condiciones de hipoxia. Los autores justifican este hecho por el alto porcentaje – hasta un 60% según CHOI, (1998) - del contenido total en proteínas correspondiente a la hemoglobina, que bajo condiciones de hipoxia ve incrementada su síntesis.

3.4.3. La relación RNA/DNA como biomarcador

El concepto base para la utilización de la relación RNA/DNA como indicador, es que, el contenido de DNA por célula viable permanece más o menos constante, pese a las variaciones de las condiciones ambientales; mientras que la concentración de RNA, directamente relacionada con el número de ribosomas y por tanto con la síntesis activa de proteínas, varía en función de la edad, el estado de desarrollo, el tamaño del organismo, el estado nutricional y las condiciones ambientales (OKUMURA *ET AL.*, 2002; ROSA & NUNES, 2003; CHÍCHARO & CHÍCHARO, 2008). Luego, bajo condiciones óptimas, en las que los recursos disponibles serán destinados a crecimiento o reproducción (síntesis proteica), la relación RNA/DNA será mayor que en situaciones en las que exista algún tipo de estrés. Por este motivo PEAKALL (1992) afirma que este parámetro constituye un indicador muy útil de crecimiento reciente y del estado general de nutrición.

CHÍCHARO & CHÍCHARO (2008) en una profunda revisión de la utilización de este biomarcador en ecología marina desde el año 1969, lo definen como un índice ecofisiológico de actividad (crecimiento, reproducción, secreción, etc.). Añaden también a las ya mencionadas, una serie de posibles aplicaciones para este indicador, tales como: la evaluación de impactos de origen natural y antrópico, el análisis de interacciones tróficas y la

medición de actividad metabólica.

Estos autores afirman que el uso de este biomarcador combinado con métodos basados en el análisis de respuestas de poblaciones y comunidades, posibilitará el desarrollo de predicciones más realistas y rigurosas de los efectos del cambio climático antropogénico sobre los ecosistemas. Estos mismos autores advierten de la necesidad de conocer los rangos de variación natural de la relación RNA/DNA y en qué condiciones se producen para validar su utilización en el análisis y la evaluación ambiental.

Con este objetivo existen varios trabajos que estudian las variaciones de dicho parámetro con relación a la calidad de la dieta en *Calanus finmarchus* (BECKER ET AL., 2005) y en *Daphnia galeata* (VREDE ET AL., 2002) obteniendo en ambos casos una correlación positiva. También han sido estudiadas las variaciones producidas en este indicador con respecto al estado de desarrollo larvario (IBIAM & GRANT, 2005) y durante la metamorfosis (GWAK & TANAKA, 2002). Estos últimos observaron en el teleosteo *Paralichthys olivaceus* un aumento progresivo de la relación RNA/DNA durante el desarrollo larvario, paralelo, como cabría esperar, al de los niveles de proteínas. Intensificado en las fases premetamórficas, este incremento tiene su punto de inflexión en el momento de la metamorfosis, decreciendo rápidamente en las etapas sucesivas. Esta pauta responde a la gran síntesis proteica (hormonas, enzimas y componentes estructurales) que requiere el proceso metamórfico y al incremento de la división celular que aumenta los niveles de DNA, que provoca el descenso de la relación en la fase postmetamórfica.

Otro factor a tener en cuenta es el tejido del cual se extraen las muestras. OLIVAR ET AL. (2009) y BARCA (2015) realizan una comparación de los valores obtenidos en distintos tejidos del mismo individuo obteniendo diferencias significativas entre tejidos y determina cuál o cuáles son más apropiados para su cuantificación. También han sido estudiadas las variaciones temporales de la relación RNA/DNA en distintos organismos. CHÍCHARO ET AL. (2001) analizaron las variaciones circadianas en *Crassostrea angulata* y *Ruditapes decussatus* y obtuvieron relaciones significativamente mayores en las muestras tomadas durante la noche. En

contraposición VIDAL *ET AL.* (2006), trabajando con paralarvas de *Loligo opalecens*, obtuvieron valores significativamente más altos de día que de noche. Estas diferencias interspecíficas implican la necesidad de conocer con claridad las características de la especie sometida a estudio.

En cuanto a las variaciones estacionales, la relación RNA/DNA suele estar sincronizada con los factores ambientales siendo mayor en las épocas de condiciones más favorables para cada especie (ROSA & NUNES, 2003). También HAINES (1980) postula que la relación RNA/DNA varía a lo largo del año, en función del peso del individuo y de la temperatura del agua; salvo en la época de reproducción, momento en el cual la relación desciende, probablemente debido a un elevado gasto energético que limita la síntesis proteica y consecuentemente la relación mencionada.

El sexo, durante la época reproductiva, parece ser un factor determinante según CHÍCHARO & CHÍCHARO (2008). Para estos autores la relación RNA/DNA será mayor en las hembras que en los machos debido a la síntesis proteica necesaria para la oogénesis; mientras que la gran cantidad de DNA producto de la espermatogénesis resulta en una baja relación en los machos.

La alteración de las condiciones ambientales produce, por lo general, una disminución en la relación RNA/DNA. Este hecho ha sido probado en diferentes especies y con diferentes tipos de estrés, de los que se muestran algunos ejemplos en la tabla 3. Dentro de éstos existen dos trabajos en los que dicha disminución no tuvo lugar: FIGUEROA *ET AL.* (1996) y MUKHERJEE & JANA (2007). En ambos casos el agente estresante es el Cu, un metal bioesencial que según MUKHERJEE & JANA (OP. CIT.) no afecta al estado fisiológico de *Oreochromis mossambicus*, ya que este tipo de metales son fácilmente asimilados y regulados por el organismo. La explicación ofrecida por FIGUEROA *ET AL.* (1996) es que este metal puede provocar daño oxidativo en el DNA, refutando la hipótesis de que esta molécula mantiene su concentración constante pese a los cambios en las condiciones ambientales. En la misma línea de argumentación, exponen que en ciertos casos de estrés químico la síntesis de proteínas de detoxificación puede provocar un aumento en el RNA y por tanto de la relación RNA/DNA.

Tabla 3. Algunos trabajos científicos sobre las variaciones de la relación RNA/DNA en función de diferentes agentes perturbadores ambientales.

Organismo	Tipo de estrés	Referencia
NEMATODOS		
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Metales	IBIAM & GRANT, 2005
CRUSTÁCEOS		
<i>Mysis relicta</i>	Ayuno y temperatura	SCHLECHTRIEM ET AL., 2008
<i>Perisesarma guttatum</i>	Varios contaminantes	AMARAL ET AL., 2009
<i>Uca annulipes</i>	Varios contaminantes	AMARAL ET AL., 2009
MOLUSCOS		
<i>Crassostrea virginica</i>	Temperatura y salinidad	HEILMAYER ET AL., 2008
<i>Loligo opalescens</i>	Ayuno	VIDAL ET AL., 2006
<i>Ruditapes decussatus</i>	Ayuno	CHÍCHARO & CHÍCHARO, 1995
<i>Sphaerium sp.</i>	Hipoxia, pH y turbidez	JOYNER-MATOS ET AL., 2007
<i>Tivela mactroides</i>	Varios contaminantes	ACOSTA & LODEIROS 2003
<i>Turbo cornutus</i>	Ayuno	OKUMURA ET AL., 2002
OSTEÍCTIOS		
<i>Catla catla</i>	Residuos procedentes de acuicultura	MUKHERJEE & JANA, 2007
<i>Clupea harengus</i>	Hidrodinamismo	HÖÖK ET AL., 2008
<i>Cyprinus carpio</i>	Hipoxia	ZHOU ET AL., 2001
<i>Labeo rohita</i>	Residuos procedentes de acuicultura	MUKHERJEE & JANA, 2007
<i>Limanda limanda</i>	Cu	GILLIERS ET AL., 2004
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ayuno	WEBER ET AL., 2003
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Residuos procedentes de acuicultura	MUKHERJEE & JANA, 2007
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Cu y Cd	FIGUEROA ET AL., 1996
<i>Perca flavescens</i>	Hídrico y térmico	GLÉMET & RODRÍGUEZ, 2007
<i>Pimephales promelas</i>	Ayuno	WEBER ET AL., 2003
<i>Pleuronectes platessa</i>	Cu	GILLIERS ET AL., 2004
<i>Solea senegalensis</i>	Cu	FONSECA ET AL., 2009
<i>Solea solea</i>	Cu	GILLIERS ET AL., 2004

3.5. BIOMARCADORES MOLECULARES

3.5.1. HSP 70

La HSP 70 forma parte de la familia de proteínas de choque térmico, (*heat shock proteins*, HSP). Estas proteínas fueron descubiertas por RITOSSA (1962) en larvas de *Drosophila buschii* expuestas accidentalmente a temperaturas elevadas. Lo que se observó inicialmente fueron los cambios en el patrón de los engrosamientos (zonas de alta actividad transcripcional) de los cromosomas politénicos de las glándulas salivales de dichas larvas. Posteriormente, los *loci* contenidos en esas zonas se relacionaron con la síntesis de una serie de nuevas proteínas que fueron denominadas 'proteínas de choque térmico' (HSPs, del inglés *Heat Shock Proteins*) (TISSIÈRES *ET AL.*, 1974). Investigaciones posteriores revelaron que no se trataba de proteínas exclusivas de la especie ni del grupo al que pertenece esta, sino que se trataba de proteínas presentes en infinidad de organismos vegetales y animales.

También se desveló que estímulos distintos al incremento de la temperatura como la exposición a diversas sustancias químicas, infecciones víricas, lesiones, radiación ultravioleta, estrés oxidativo, o la falta de nutrientes entre otros, desencadenan el incremento en la síntesis de estas proteínas (MORIMOTO *ET AL.*, 1992). Debido a este amplio conjunto de agentes desencadenantes actualmente se las denomina proteínas de estrés. No obstante, muchas de estas proteínas poseen funciones muy diversas y se sintetizan de forma constitutiva en las células en ausencia de estrés (HARTL & HAYER-HARTL, 2002, HERRERO, 2013).

En situaciones de normalidad las HSPs se unen transitoriamente y no covalentemente a polipéptidos sin plegar o recién sinterizados así como a proteínas sin ensamblar con el fin de evitar uniones no productivas, también juegan un papel importante en el control de calidad de proteínas mal plegadas y favorecen la eliminación de las proteínas que están dañadas

de forma irreversible (MADRIGAL-MATUTE *ET AL.*, 2009).

Estas proteínas se suelen clasificar según su tipo de expresión y según su peso molecular. Según su tipo de expresión se ubican dentro de dos grandes grupos: las que se expresan de forma constitutiva (en condiciones normales) y las que lo hacen de modo inducible (frente a un estímulo). Según su peso molecular y función se clasifican en cinco familias:

Las proteínas de estrés de bajo peso molecular o LMW (*low molecular weight stress proteins*), que comprende un grupo heterogéneo de proteínas con pesos moleculares que van desde los 14 a los 40 kDa. A diferencia de las demás, las proteínas de esta familia no se expresan de forma constitutiva, sino sólo bajo condiciones de estrés (SCHRAMM *ET AL.*, 1999).

Las proteínas de estrés-60 (*stress-60 protein family*) poseen un peso molecular de entre 40 y 60 kDa. Han sido halladas tanto en bacterias como en cloroplastos y mitocondrias. Algunas las funciones en las que están implicadas son el ensamblaje de oligómeros proteicos y el ensamblaje y plegamiento de polipéptidos traslocados dentro de orgánulos (SCHRAMM *ET AL.*, 1999).

Las proteínas de estrés-70 (*stress-70 proteins family*) Es la familia más conservada de todas, y su peso molecular oscila entre los 66 y los 78 kDa. Se ha descrito su implicación en procesos como: la degradación de ciertas proteínas del citosol, la estabilización intracelular de precursores proteicos sin plegar o recién sintetizados antes de su ensamblaje en el citosol o dentro de orgánulos, en la estabilización de péptidos traslocados antes de su plegamiento o ensamblaje, en la reorganización de oligómeros proteicos y en la disolución de agregados de proteínas. Esta familia es la más profusamente investigada y que ha dado lugar al mayor número de intentos de utilización en bioensayos. Es a este grupo al que pertenecen la proteínas utilizadas en esta tesis a través de la cuantificación de la expresión génica de sus dos formas, la constitutiva: HSP 70c y la activada: HSP 70p respectivamente (SCHRAMM *ET AL.*, 1999; HERRERO, 2013).

Las proteínas de estrés-90 (*stress-90 proteins family*) cuyo peso se haya entre los 87 y los 92 kDa. Actúan como chaperonas en la estabilización

de varias proteínas como factores de transcripción o señales celulares inactivas (SCHRAMM *ET AL.*, 1999).

Las proteínas de estrés de alto peso molecular (*high molecular weight stress proteins*, HMW) poseen un peso molecular de entre 100 y 110 kDa y es frecuente en esta familia la ausencia de inducción por estrés. Sin embargo y aunque se sabe poco acerca de su función y prevalencia, la expresión de la HSP104 y de la HSP 110 parece estar inducida por un amplio rango de agentes estresantes (SCHRAMM *ET AL.*, 1999).

Cada una de estas familias incluye proteínas que pueden diferir en su localización, su función o su capacidad para ser inducidas en respuesta a un aumento de temperatura u otras situaciones de estrés (WHITESELL & LINDQUIST, 2005; MAYER & BUKAU, 2005).

El potencial como biomarcador de este grupo de proteínas radica en la sensibilidad de inducción de síntesis frente a diferentes estímulos y en su ubicua presencia en la mayoría de organismos. La respuesta transcripcional de las HSPs sigue una pauta proporcional al grado de estrés hasta un máximo. Una vez sobrepasado este umbral de exposición, la expresión de las proteínas de estrés disminuye debido a la inhibición de los procesos de síntesis proteica a causa del propio estrés. Por este motivo, sólo es posible realizar un análisis ambiental preciso utilizando estas proteínas de estrés cuando se puede determinar si los niveles de expresión o concentración corresponden a la parte ascendente o descendente de la curva de dinámica de respuesta. Por eso, la mayoría de trabajos realizados con estas proteínas emplean también otros tipos de biomarcadores que complementan y refuerzan los resultados (SCHRAMM *ET AL.*, 1999; PLANELLÓ, 2009; HERRERO *ET AL.*, 2015).

Las dos proteínas de las que se ha evaluado la expresión génica en este trabajo son la HSP70 y la HSC70:

HSC70. Se expresa de forma constitutiva y coopera con chaperonas interaccionando con gran número de moléculas para llevar a cabo múltiples funciones celulares: prevención de plegamientos prematuros o formación de agregados durante la síntesis proteica, traslado de

polipéptidos precursores a través de las membranas de la mitocondria, del retículo endoplasmático y de lisosomas, disociación de complejos proteicos, interacción con la bicapa lipídica, afectando a la fluidez de la membrana celular y relocalización en el núcleo ante situaciones de estrés (LIU *ET AL.*, 2012; HERRERO, 2013).

HSP70. Se expresa de forma inducible ante situaciones de estrés. Interviene en los siguientes procesos: tolerancia a hipertermia, a hipoxia, a radiación ultravioleta y a endotoxinas, regulación de la respuesta a choque térmico, recuperación de la actividad transcripcional y traduccional tras él y reducción de la desnaturalización proteica por exposición a calor, formación de tumores y proliferación celular, resistencia a peróxido de hidrógeno, resistencia de células tumorales a monocitos sensibilidad a células asesinas activadas por linfocinas, salida del arresto del ciclo celular inducido por drogas, glucosilación de proteínas y procesos de apoptosis y de resistencia a ella (FEDER & HOFMANN, 1999). También se ha demostrado su implicación como chaperona en el plegamiento de proteínas (MAYER & BUKAU, 2005), entre ellas el receptor hormonal de la ecdisona (GEHRING, 1998).

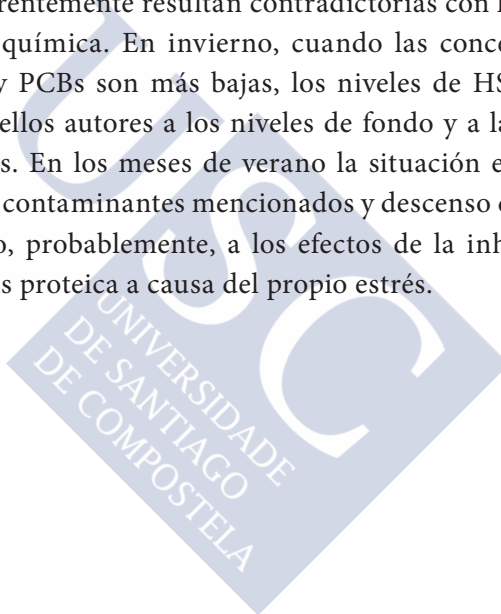
Se ha demostrado que al someter a las larvas de *C. riparius* a un incremento de temperatura, sus células experimentan una disminución generalizada de la actividad transcripcional en la mayoría de los genes activos, sin embargo la cantidad de las HSPs aumenta significativamente debido a la activación de los *loci* que codifican para ellas (MORCILLO *ET AL.*, 1993; MORCILLO *ET AL.*, 1997; HERRERO, 2013).

Existen muchos trabajos en los que se ha estudiado la variación en los niveles de expresión de los genes que codifican para estas proteínas frente a una exposición a contaminantes ambientales de naturaleza variada en el seno de *C. riparius* (LEE *ET AL.*, 2006; PARK & KWAK, 2008 ; PLANELLÓ *ET AL.*, 2008; LANGER-JAESRICH *ET AL.*, 2010; PLANELLÓ *ET AL.*, 2010; MORALES *ET AL.*, 2011; NAIR & CHOI, 2011 A; HERRERO, 2013).

No obstante, sigue habiendo aspectos todavía poco estudiados, conocimientos que serán necesarios para poder aprovechar todo el

potencial en materia de análisis ambiental, que estas proteínas podrían ofrecer. Aún siguen siendo necesarios estudios que valoren la sensibilidad y la especificidad de estas técnicas y exhaustivos estudios de campo que aporten información sobre la dinámica de los niveles de expresión de estas proteínas en ecosistemas naturales.

Según SCHRAM *ET AL.* (1999) se ha de ser cauteloso con la interpretación de los resultados, ya que, por ejemplo, en trucha común -*Salmo trutta*- y lobo de río -*Barbatula barbatula*-, se han registrado variaciones estacionales de las concentraciones de proteínas de estrés bajo condiciones naturales, que aparentemente resultan contradictorias con la severidad de la contaminación química. En invierno, cuando las concentraciones de pesticidas, PAHs y PCBs son más bajas, los niveles de HSPs aumentan, debido, según aquellos autores a los niveles de fondo y a la acumulación de los xenobióticos. En los meses de verano la situación es la contraria, altos niveles de los contaminantes mencionados y descenso de la expresión de HSP 70, debido, probablemente, a los efectos de la inhibición de los procesos de síntesis proteica a causa del propio estrés.



3.6. ENZIMAS BIOTRANSFORMANTES

El proceso de detoxificación se puede definir como el conjunto de reacciones metabólicas llevadas a cabo por un organismo para la eliminación de una sustancia exógena. Entre los sistemas generados por la evolución para tal fin se encuentra el de metabolización o biotransformación de la sustancia. Este proceso consiste, principalmente, en la conversión de sustancias lipofílicas en sustancias hidrofílicas, mucho más fáciles de metabolizar; y se puede dividir en tres fases diferenciadas: Fase I, Fase II y Fase III.

En la fase I las sustancias lipofílicas son transformadas mediante diferentes procesos que dan lugar a la aparición de nuevos grupos funcionales. Reacciones habituales incluidas en esta fase son las reducciones, oxidaciones, hidrólisis, hidrataciones, desalquilaciones y deshalogenaciones; aunque unas de las más frecuentes son las de monooxidación y hidroxilación catalizadas por el citocromo P450 (CYP450). Si al final de esta fase el producto es un metabolito polar, será excretado directamente; pero, si por el contrario, no es lo suficiente hidrosoluble, se produce una segunda reacción de transformación que corresponde con la Fase II.

En la fase II los metabolitos resultantes de la fase I se conjugan con moléculas orgánicas endógenas como el ácido glucurónico, el glutatión, algunos sulfatos o aminoácidos. El producto son metabolitos menos reactivos y más solubles; y por lo tanto más fácilmente excretables que los resultantes de la fase I. Una de las reacciones más frecuentes es la conjugación con glutatión, catalizada por la enzima glutatión S-transferasa.

Algunos productos de las reacciones de la Fase II pueden ser nuevamente metabolizados en la Fase III o excreción. En ésta los grupos aniónicos de los productos de la Fase II actúan como dianas para distintos transportadores de membrana, entre los que se encuentran la P-glicoproteína y la familia de proteínas de resistencia a multidroga (MRP, del inglés *Multidrug Resistance Protein*).

La familia del citocromo P450 (CYP450) y la de la glutatión S-transferasa (GST) son grupos de enzimas detoxificadoras multifuncionales, que

juegan un importante papel en los procesos de detoxificación de una gran variedad de compuestos, tanto xenobióticos como endógenos (COCHRANE & LEBLANC, 1986; FEYEREISEN, 1999; SCOTT & WEN, 2001; YANG *ET AL.*, 2007; GUI *ET AL.*, 2009).

3.6.1. Citocromo P450

El sistema enzimático del citocromo P450 es una familia de isoenzimas muy amplia y diversificada; tanto, que es una de las familias génicas con más integrantes de las que han sido secuenciadas. En insectos se han descrito seis tipos, cinco de ellos exclusivos de este grupo (FEYEREISEN, 1999). Su función principal es la metabolización oxidativa de señales endógenas, drogas y xenobióticos (LEWIS & ITO, 2008)

Los citocromos son enzimas que están implicadas en reacciones de hidroxilación aromática, hidroxilación alifática, N-desalquilación, O-desalquilación, desaminación, N-oxidación y sulfoxidación. Son relativamente poco específicas en cuanto al sustrato; cada una tiene un conjunto de sustancias diana que se solapan entre isoenzimas; de tal modo que el espectro de sustancias susceptibles de ser metabolizados por alguna forma de CYP 450 incluye prácticamente cualquier xenobiótico. Esa gran diversidad explica las variaciones en la biotransformación y toxicidad de muchos xenobióticos en diferentes especies, e incluso entre distintos individuos (BRATTSTEN, 1986; SCOTT, 1999; REPETTO & REPETTO, 2009).

No todas las enzimas de este grupo metabolizan xenobióticos, algunas se encargan de catalizar procesos fisiológicos básicos como la síntesis y degradación de señales hormonales endógenas (GILBERT & WARREN, 2005). Parece, según la respuesta de genes concretos de esta familia, que deben existir interacciones entre la exposición a sustancias químicas y las funciones endocrinas. Por ejemplo, el CYP450 interviene directamente en el metabolismo de la ecdisona y la hormona juvenil (KAYSER *ET AL.*, 1997; FEYEREISEN, 1999; GUITTARD *ET AL.*, 2011).

Se ha demostrado la inductibilidad de la síntesis de estas proteínas, mediante la detección de variaciones en los niveles de expresión de los genes de la familia CYP450, por exposición a xenobióticos en insectos (SCOTT, 2008) y más concretamente en *C. riparius* (MARTÍNEZ-PAZ ET AL., 2012). Distintos estudios sobre los procesos biológicos de toxicación y detoxificación

Además, según BOLT & ROS (2008) el análisis de los niveles de proteína mediante técnicas catalíticas o inmunológicas ha resultado ser un método adecuado para supervisar los efectos de la contaminación. Aunque la información sobre estos genes en especies de quironómidos es relativamente escasa, miembros del equipo de investigación de toxicología de la UNED han logrado caracterizar y secuenciar el gen CYP4G de *C. riparius* (MARTÍNEZ-PAZ ET AL., 2012), lo que ha posibilitado el uso de dicho gen como sonda en este trabajo, entre otros.

Para llegar a una comprensión completa del papel metabólico que desempeña esta familia de genes, aún debe profundizarse en el conocimiento del patrón de respuesta de ésta y de sus inductores; así como de los mecanismos moleculares de toxicidad y del modo de acción de los xenobióticos. Entonces la cuantificación de expresión génica del CYP450 podría llegar a ser un buen biomarcador en estudios ecotoxicológicos (SNELL ET AL., 2003).

3.6.2. GST

La glutatión S-transferasa es una familia de enzimas presente en prácticamente todos los organismos aerobios. Estas enzimas catalizan, en la fase II de detoxificación, la unión del glutatión sintetizado por el propio organismo, con los compuestos electrofílicos habitualmente producidos de la fase I, (BOARD & MENON, 2013). Esto evita una unión covalente de los compuestos con las macromoléculas biológicas como proteínas y ácidos nucleicos, y reduce las consecuencias tóxicas, ya que incrementa la solubilidad del compuesto electrofílico, facilitando la excreción de la

molécula del organismo (BOARD & MENON, 2013).

Estas enzimas catalizan la unión del glutati6n a compuestos tanto end6genos como ex6genos: participan en el transporte intracelular, la bios6ntesis de hormonas y la protecci6n frente a estr6s oxidativo y est6n implicadas en la detoxificaci6n y biotransformaci6n de varios carcin6genos y un n6mero considerable de medicamentos (ENAYATI *ET AL.*, 2005).

Se han relacionado incrementos en la cantidad y actividad de GST citos6lica en respuesta a compuestos qu6micos en insectos (MANNERVIK *ET AL.*, 1985), y m6s concretamente se ha vinculando el aumento de la actividad enzim6tica y la producci6n de diferentes isoformas con la resistencia a insecticidas (HEMINGWAY *ET AL.*, 1998; RANSON & HEMINGWAY, 2005; CHE-MENDOZA *ET AL.*, 2009).

Estas enzimas tambi6n se han relacionado con procesos de biorremediaci6n y de la protecci6n celular frente a ep6xidos y especies reactivas de ox6geno (CREANEY *ET AL.*, 1995; ESCARTIN & PORTE, 1996; TJALKENSET *ET AL.*, 1998; NAIR Y CHOI, 2011 B).

Otra funci6n confirmada en quiron6midos de la GST es la de biotransformaci6n de distintos contaminantes org6nicos como hidrocarburos arom6ticos polic6clicos (PAHs, del ingl6s *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) (YUEN & HO, 2001; RAKOTONDRAVELO *ET AL.*, 2006; PARK *ET AL.*, 2010; MART6NEZ-PAZ *ET AL.*, 2012).

As6, la cuantificaci6n de la actividad enzim6tica de la GST es considerada un indicador veros6mil de efectos metab6licos de la exposici6n a distintos contaminantes.

3.7. DISRUPCIÓN ENDOCRINA: EL ECR

En los quironómidos, como en el resto de los insectos, los procesos de muda y desarrollo están bajo control neuroendocrino. Grupos de células neurosecretoras del protocerebro estimulan a través de sus axones los corpora cardiaca. Este es un órgano neurohemal cuya secreción principal, la hormona protoracicotrópica (PTTH, del inglés *Prothoracicotropic Hormone*), es liberada al líquido circulatorio y tiene como diana las glándulas torácicas y los *corpora allata*. Ambos son órganos endocrinos que, entre otras funciones, se encargan de segregar las hormonas ecdisonesteroides (glándulas torácicas) y la hormona juvenil (*corpora allata*). Estas dos hormonas son las responsables, casi en exclusiva, de regular los cambios en el patrón de expresión génica asociados a los procesos de crecimiento y diferenciación tisular (RIDDIFORD, 1993).

La hormona juvenil estimula la síntesis de tejidos juveniles o larvarios, mientras está presente en una concentración determinada no se inicia el proceso de metamorfosis. La ecdisona se encarga de regular los procesos de muda durante el desarrollo del animal, cada período de muda o ecdisis está siempre precedido de un aumento significativo de la concentración tisular de esta hormona. Cuando se produce un pico en la concentración de ecdisona, en ausencia o en concentración insuficiente de hormona juvenil, se desencadena el inicio de la metamorfosis (BURSELL, 1970).

La ecdisona tal y como es segregada por las glándulas torácicas no posee actividad endocrina, para ser funcional debe ser procesada por el cuerpo graso y los tejidos periféricos para dar lugar a su metabolito activo, la hormona 20-hidroxiecdisona (20E) (GILBERT *ET AL.*, 2002).

El receptor nuclear de la ecdisona (EcR, del inglés *Ecdysone Receptor*), se activa al unirse la hormona y actúa como un factor de transcripción; pero para ello es necesario que el EcR forme previamente un heterodímero mediante la unión a la proteína ultraspiráculo (USP, del inglés *Ultraspiracle*) (BROWNING *ET AL.*, 2007). La USP actúa como un efector alostérico de EcR, pero no contribuye a su función intrínseca, no tiene ligandos conocidos.

El trímero compuesto por la 20E, el EcR y la USP se une al promotor de los genes de respuesta hormonal, lo que inicia la cascada de cambios en la expresión de numerosos genes responsables de la mayoría de las transformaciones que sufren los insectos en su desarrollo (YAO *ET AL.*, 1992, 1993).

Los ecdisoesteroides son hormonas esteroideas que representan un papel importante en el desarrollo, crecimiento, muda de la larva y reproducción en *Chironomus* (NAIR & CHOI, 2012). El hecho de sufrir la metamorfosis bajo control hormonal hace de este organismo una valiosa herramienta para estudios ecotoxicológicos que tengan como finalidad conocer los efectos que la exposición a contaminantes pueda producir en su sistema endocrino (ZOU & FINGERMAN, 1997; MU & *ET AL.*, 2005; RODRÍGUEZ *ET AL.*, 2007; PLANELLÓ *ET AL.*, 2008), que es en definitiva regulador de etapas del desarrollo como la embriogénesis, el crecimiento, la metamorfosis y la reproducción (WATTS *ET AL.*, 2001). Asimismo, la similitud con la secuencia de cambios en los niveles de hormona y receptor en trabajos con *Drosophila melanogaster* y vertebrados (SYMS *ET AL.*, 1985; DEAK & LAUFER, 1995; DEAK *ET AL.*, 1998) permiten pensar en *Chironomus riparius* como un buen modelo predictivo (PLANELLÓ, 2009; HERRERO *ET AL.*, 2015).

3.8. BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS: DEFORMIDADES COMO MEDIDA DEL ESTRÉS AMBIENTAL

Una deformidad puede ser definida como una característica morfológica que se aparta de su configuración normal, excluyendo los efectos del deterioro mecánico (WARWICK, 1988; MADDEN *ET AL.*, 1995). Las deformidades pueden ser consideradas respuestas subletales de los organismos a agentes estresantes (VERMEULEN, 1995), por lo que constituyen adecuados indicadores precoces de estados de estrés ambiental.

Existen innumerables agentes causales citados en la bibliografía como inductores de dichas anomalías morfológicas. Éstos van desde variaciones extremas de las condiciones fisicoquímicas en el ambiente en el que vive un organismo, tales como variaciones de temperatura o pH, hasta la acción de distintos parásitos o los efectos de numerosas sustancias contaminantes.

Los grupos de organismos utilizados en este tipo de estudios son muy diversos. Como ejemplos se puede destacar la existencia de trabajos en los que se estudian deformidades en estructuras tan dispares como hifas de hongos (GARDEA-TORRESDEY *ET AL.*, 1997), esqueletos de foraminíferos (YANKO *ET AL.*, 1998), esqueletos de equinodermos (CATOIRA & MÍGUEZ, 1999) o picos de aves (RYCKMAN *ET AL.*, 1998; KUIKEN *ET AL.*, 1999). Estos estudios son comunes en organismos de agua dulce, principalmente en macroinvertebrados, anfibios y peces. En estos grupos se han estudiado tanto el tipo de anomalías morfológicas presentes en distintas estructuras como las posibles causas de las mismas (ASHLEY *ET AL.*, 1975; VALENTE, 1988; OUELLET *ET AL.*, 1997; DEGITZ *ET AL.*, 2000).

3.8.1. Deformidades en quironómidos

Entre los macroinvertebrados, los quironómidos constituyen el grupo en el que se han utilizado con mayor frecuencia las deformidades como indicadores de estrés ambiental. La observación de incrementos notables en las frecuencias de individuos deformes de una población, posibilitaría la detección del daño antes de que afectase a niveles superiores de organización; ventaja compartida con otros tipos de biomarcadores; sin embargo existen otras exclusivas de este biomarcador.

- **Permanencia de la respuesta.** Las deformidades representan respuestas físicas directas a contaminantes que no pueden ser modificadas o alteradas por el muestreo.
- **Almacenamiento.** Las preparaciones microscópicas de especímenes constituyen un registro permanente de las interacciones contaminante-individuo, que pueden ser guardadas para futuras comparaciones e intercambios entre investigadores. Las colecciones de este tipo de preparaciones permanentes son particularmente importantes en programas de control y vigilancia y en aquellos donde se llevan a cabo acciones de restauración del medio.
- **Conservación.** Las larvas de quironómidos, especialmente las cápsulas cefálicas, permanecen en bastante buen estado de conservación en los sedimentos, por lo que estos registros son importantes para el estudio de cambios en la estructura de poblaciones y comunidades en períodos largos de tiempo, así como de variaciones en las respuestas morfológicas.

El primer estudio sobre deformidades en larvas de quironómidos fue el realizado por HAMILTON & SAETHER (1971) en varios lagos canadienses contaminados; desde entonces se han realizado infinidad de estudios (VERMEULEN, 1995; DE BISTHOVEN, 2000)

Las deformidades descritas con mayor frecuencia en la bibliografía son las que afectan a estructuras de la cápsula cefálica tales como antenas, mentum (lígula en el caso de *Procladius*), mandíbulas, premandíbulas y peine epifaríngeo (en *Chironomus*) y sólo ocasionalmente aparecen deformidades

en la lamela labral y sedas labrales de *Chironomus*. Se incluyen entre los tipos de anomalías las hendiduras, reducciones, asimetrías, pérdida o aparición de dientes, presencia de huecos más o menos grandes, y fusiones y distorsiones de la morfología original (VERMEULEN, 1995; JANSSENS DE BISTHOVEN, 2000)

Las frecuencias de individuos deformes obtenidas en los trabajos realizados hasta el momento varían desde los pequeños valores encontrados en material subfósil, entre 0 y 0.8% (WARWICK, 1980; WIEDERHOLM, 1984; KLINK, 1985), hasta frecuencias del 60 o 70 % (HARE & CARTER, 1976; MADDEN ET AL., 1992; VERMEULEN ET AL., 2000).

Varios autores han destacado la diferente tendencia de los géneros de quironómidos estudiados a presentar deformidades en condiciones de estrés (HAMILTON & SAETHER, 1971; HARE & CARTER, 1976; WIEDERHOLM, 1984; URK ET AL., 1985; WARWICK, 1985; 1988; HUDSON & CIBOROWSKI, 1996). De entre todos ellos, *Chironomus* parece ser el género con mayor predisposición a presentar anomalías morfológicas y, en la mayor parte de los casos, dichas diferencias se relacionan directamente con el modo de vida y la utilización de diferentes recursos alimentarios. SERVIA ET AL. (1998) observan una respuesta similar tras el análisis de larvas de *Prodiamesa olivacea* y *Chironomus riparius* que comparten el mismo hábitat, y muestran que *P. olivacea* presenta siempre una menor frecuencia de deformidades y que existe una correlación lineal entre la severidad de las anomalías presentes en ambas especies.

Se han citado como posibles agentes causales de las deformidades observadas en el campo diferentes tipos de compuestos, tales como metales pesados, pesticidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc. (HAMILTON & SAETHER, 1971; CUSHMAN, 1984; WIEDERHOLM, 1984; JANSSENS DE BISTHOVEN ET AL., 1995), aunque en la mayoría de los casos la aparición de deformidades se ha relacionado con tipos de contaminación en general: industrial, agrícola, urbana... Además de todos estos tipos de contaminantes químicos, se ha hecho referencia también a la elevación de la temperatura como posible agente causal de las aberraciones (WARWICK ET AL., 1987).

Estos hallazgos se han visto confirmados en el laboratorio mediante la

inducción de deformidades con metales pesados (KOSALWAT & KNIGHT, 1987; MICHAILOVA & BELCHEVA, 1990; JANSSENS DE BISTHOVEN, 1995; VERMEULEN ET AL., 2000 A), pesticidas (WARWICK, 1985; MADDEN ET AL., 1992), o compuestos orgánicos como el xileno (JANSSENS DE BISTHOVEN ET AL., 1997). Sin embargo, en muy pocos de estos experimentos se obtiene una relación dosis-respuesta clara (KOSALWAT & KNIGHT, 1987; MADDEN ET AL., 1992; JANSSENS DE BISTHOVEN ET AL., 1997; VERMEULEN ET AL., 2000 A).

VERMEULEN ET AL. (2000) han señalado los disruptores endocrinos como posibles inductores de deformidades en larvas de quironómidos, entre los que se encuentran sustancias tales como pesticidas o PCBs. Concretamente el 4-nonilfenol ha mostrado una relación directa con la incidencia de deformidades en el mentum de *Chironomus riparius* (MEREGALLI ET AL., 2001). Estos compuestos presentan una estructura muy similar a las hormonas esteroideas de los animales, por lo que pueden ser reconocidos por los receptores de dichas hormonas y provocar así fallos en los procesos de desarrollo o reproductivos.

El Laboratorio de Hidrobiología del Departamento de Zooloxía e Antropología física de la Universidad de Santiago de Compostela lleva coordinando estudios sobre esta materia desde el año 1993. Desde entonces se han realizado diversos muestreos de campo, muchos de ellos en la misma estación del río Sar que se describe en esta memoria. Las investigaciones realizadas incluyeron la descripción de las deformidades de larvas de *Chironomus riparius* y *Procladius olivacea*, el estudio de las variaciones espaciales y temporales de su frecuencia y tipos, la viabilidad de los individuos teratológicos, el estudio del ajuste de índices de severidad de las deformidades a nuestros datos, sus variaciones espaciales y temporales, así como la existencia y posibles causas de las deformidades en larvas recién eclosionadas. Además, se adaptó, para su uso en *P. olivacea*, un índice de severidad, diseñado inicialmente para larvas de *Chironomus* (SERVIA, 1996; SERVIA ET AL., 1998 A; 1998 B; 1999 A; 1999 B; 2000 A; 2000 B).

Se ha especulado con la idea de que las larvas con las piezas bucales deformadas e incluso rotas pudieran ver limitada su capacidad de desarrollo como consecuencia de las dificultades de alimentación (URK & KERKUM,

1987); sin embargo esta hipótesis ha sido prácticamente rechazada en estudios posteriores (MADDEN *ET AL.*, 1995; JANSSENS DE BISTHOVEN, 1995; GERHARDT & JANSSENS DE BISTHOVEN, 1995; JANSSENS DE BISTHOVEN *ET AL.*, 1998).

Un fenómeno que ha llevado a la discusión de la posible respercusión de las deformidades en el ciclo vital de *Chironomus* ha sido la existencia de diferencias estacionales en la frecuencia de deformidades en regiones templadas con máximos valores en invierno y mínimos en verano (URK *ET AL.*, 1992; VERMEULEN, 1998; SERVIA *ET AL.*, 1999 A). URK *ET AL.* (1992) explican sus observaciones basándose en la teoría de la inhibición del crecimiento y del desarrollo por parte de los contaminantes (WENTSEL *ET AL.*, 1978), que provocarían un retraso en el desarrollo de las larvas deformes. JANSSENS DE BISTHOVEN *ET AL.* (1993) atribuyen el fenómeno a las diferentes condiciones de temperatura, de manera que en los períodos cálidos se acorta el desarrollo y la frecuencia de alteraciones es menor, de la misma forma que, según sus observaciones, en regiones tropicales la frecuencia de aparición de larvas deformes es también menor que en zonas templadas, hipótesis que coincide con la sugerida por VERMEULEN (1998).

La transmisión ontogénica de las deformidades entre los diferentes estados del desarrollo se ha comprobado que los contaminantes mutagénicos provocan alteraciones en todos los estados del ciclo vital (MICHAILOVA & BELCHEVA, 1990). Sin embargo, SERVIA *ET AL.* (1999 A) establecen que esas deformidades no se transmiten a ninguno de los posteriores estados del ciclo vital, habiendo observado únicamente alteraciones morfológicas en las cápsulas cefálicas larvianas, mientras que en las exuvias pupales no se encontró ninguna anomalía notoria. Además, los adultos provenientes de larvas deformes no muestran alteraciones apreciables (B. GODDEERIS, com. pers.)

En resumen, a tenor de la bibliografía manejada, hemos considerado adecuado el uso de las frecuencias relativas de deformidades del mentum en *C. riparius*, como biomarcador de estrés en el estudio de variabilidad interpoblacional realizado para este trabajo.







CAPÍTULO 4. MATERIAL Y MÉTODOS



4.1. TOMA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Para la realización de este trabajo se emplearon larvas de *C. riparius* y *P. olivacea* procedentes de poblaciones silvestres o de cultivo de laboratorio. Las de origen silvestre se recolectaron en estaciones de muestreo, constituidas por sectores de río de aproximadamente unos 100 m². Todos los muestreos de campo se realizaron de forma selectiva, escogiendo los microhábitats más idóneos para estos animales dentro de cada estación, lugares con una velocidad de corriente muy baja, sedimento fino y con acumulación de materia orgánica sobre éste (figura 10).



Figura 10. Recolección de muestras en la estación del río Sar en Bertamiráns.

La recolección en las estaciones de muestreo se llevó a cabo con una pequeña red de mano de 15 cm de diámetro, 20 cm de profundidad y 250 μm de luz de malla. A continuación se procedió a la separación y lavado de los individuos utilizando un tamiz de 250 μm de luz de malla. Las larvas se pasaron a recipientes herméticos de plástico con sedimentos y agua de la estación. Todas las muestras fueron etiquetadas

convenientemente antes de su traslado al laboratorio, durante el que se mantuvieron ligeramente refrigeradas y preservadas de la luz. Una vez allí, las larvas se seleccionaron, pesaron y congelaron inmediatamente conservaron a -80°C en crioviales adecuados y en grupos de cinco individuos hasta su procesado.

En cada estación de muestreo se registraron los valores de los parámetros fisicoquímicos más importantes. Se midieron: la temperatura, el pH, los sólidos en suspensión (TDS) y la conductividad con un multímetro portátil Crison MM40+ y el oxígeno disuelto y la saturación de oxígeno con un oxímetro portátil YSI 550^a.

4.1.1. Estudio estacional

Para la realización de esta parte del trabajo se efectuaron muestreos mensuales, entre los meses de mayo de 2010 y abril de 2011 en la estación situada en el río Sar, descrita en el epígrafe 4.1.4. Se intentaron recolectar, como mínimo, 45 larvas de estadio IV de *Chironomus riparius* y de *Prodiamesa olivacea* en cada uno de los muestreos mensuales, aunque no siempre fue posible alcanzar dicho número, por este motivo los análisis estadísticos de este estudio se realizaron organizando los datos de manera bimensual. En total se recogieron alrededor de 2000 individuos que fueron transportados al laboratorio vivos en recipientes con agua y sedimentos de la estación de muestreo, convenientemente aireados y ligeramente refrigerados. Una vez allí fueron seleccionados los individuos comprendidos entre las fases IV y VI del estadio IV (GODDEERIS *ET AL.*, 2001) con la intención de reducir todo lo posible la variabilidad ontogénica. Una vez determinada la fase de desarrollo se pesaron los ejemplares adecuados y se congelaron a -80°C en crioviales. Todo el proceso de datación, pesaje y manipulación de las larvas se realizó lo más rápidamente posible para tratar de reducir todo lo posible el estrés.

4.1.2. Estudio ontogénico

Para el estudio de variabilidad ontogénica se realizó un único muestreo para cada especie en la estación del río Sar, situada en la localidad de Bertamirás y descrita en epígrafes posteriores. La elección de esta localidad se debió principalmente a la abundancia existente de larvas de ambas especies.

Se recogieron aproximadamente mil larvas de cada especie en dos días distintos, de las que se seleccionaron, dataron, pesaron y congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, aproximadamente trescientas de cada especie.

Se trató de reducir la influencia de la manipulación sobre los individuos de dos maneras: acortando todo lo posible el tiempo del proceso y congelando todas las larvas al mismo tiempo; de manera que todos los individuos estuviesen expuestos al mismo grado estrés y tiempo de manipulación de este proceso; para ello se mantuvieron en recipientes con medio y aireación adecuados hasta que se terminó el proceso de determinación de la edad de todas las larvas empleadas en el experimento. Desde la recolección de las larvas hasta el congelado de los viales, transcurrieron aproximadamente 16 h y se realizó en jornadas separadas, para *C. riparius* el día 27 de julio de 2011 y para *P. olivacea* el 5 de mayo de 2011.

4.1.2.1. Determinación de la edad de las larvas de *C. riparius*

La determinación del estadio larvario se realizó mediante la comparación de los tamaños de las cápsulas cefálicas entre individuos de la misma muestra. Se tomó como referencia la capsula cefálica de una prepupa y por comparación se seleccionaron después las larvas en estadio IV.

Dentro del estadio IV se establecieron cinco clases de edad tomando como base el trabajo de GODDEERIS *ET AL.* (2001), que determinan nueve etapas dentro del estadio IV para las larvas de *C. riparius*. Para este trabajo se agruparon las ocho primeras etapas de dos en dos y se mantuvo la etapa IX como una clase independiente. Esta simplificación se debió a una cuestión

práctica, ya que las fases establecidas por GODDEERIS *ET AL.* (2001) son ciertamente difíciles de diferenciar en larvas vivas y sin usar un microscopio.

La agrupación de etapas permitió tomar estructuras de referencia para determinar la clase de desarrollo con la ayuda de un estereomicroscopio con una fuente de luz fría, evitando así el calentamiento de las larvas por la luz del microscopio. La observación de cada larva se realizó con sumo cuidado y lo más rápido posible, colocando cada larva en una gota de agua sobre un portaobjetos y depositando con cuidado un cubreobjetos.

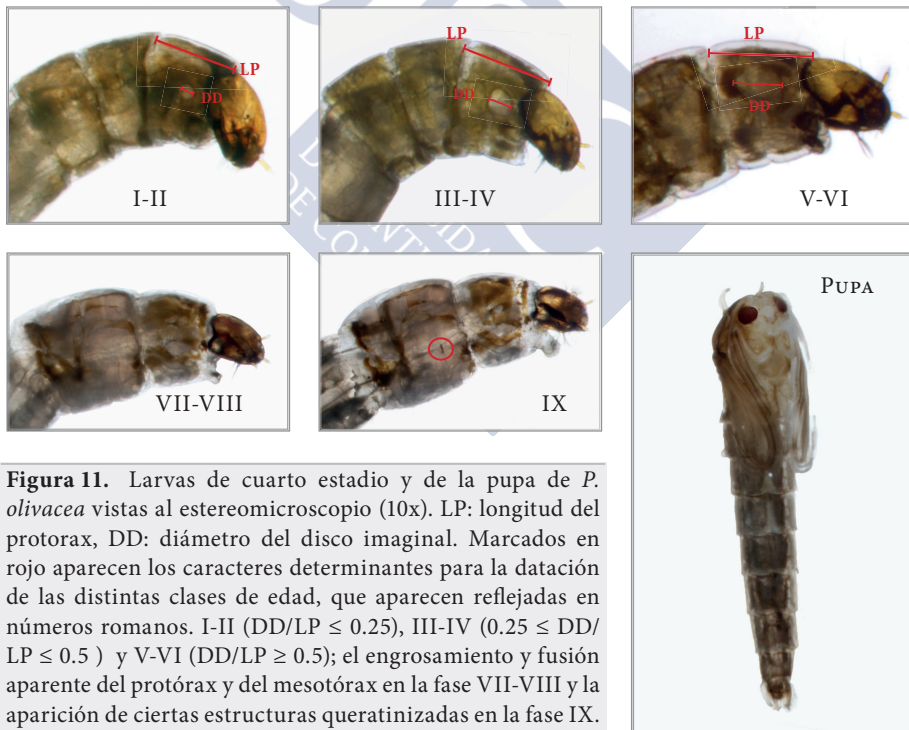
Bajo un estereomicroscopio dotado con un epiiluminador y mediante pequeños deslizamientos del cubreobjetos se observaron las estructuras definitorias de clase de desarrollo. Se descartaron aquellas larvas que se presentaban características poco claras por estar en un punto de desarrollo intermedio o muy cerca del cambio de clase. De esta forma se definieron seis submuestras: larvas de clase I-II, larvas de clase III-IV, larvas de clase V-VI, larvas de clase VII-VIII, larvas de clase IX y pupas.

4.1.2.2. Determinación de la edad de las larvas de *P. olivacea*

Para la determinación del estado estadio larval de las larvas de *P. olivacea* se siguió el mismo método empleado con las de *C. riparius*: se comparó el tamaño de las cápsulas cefálicas entre los individuos de la misma muestra. Sin embargo, para la determinación de la clase de desarrollo dentro del estadio IV se hubieron de salvar dos obstáculos en comparación con el caso de *C. riparius*: la ausencia de un estudio similar al realizado por GODDEERIS *ET AL.* (2001) con *C. riparius*, en el que se establezca una clasificación por etapas del IV estadio en *P. olivacea* y la dificultad de observación de las estructuras de los discos imaginales en esta especie, debido, posiblemente, al mayor grosor y opacidad de la cutícula. Si bien es cierto que mediante el microscopio se pueden reconocer rasgos estructurales homólogos a los descritos por GODDEERIS *ET AL.* (*OP CIT.*), ese proceso implicaría un notable incremento tanto en el tiempo de manipulación como en el estrés debido

a la temperatura generada por la iluminación diascópica. Por eso se optó por una clasificación homóloga a la empleada en *C. riparius* pero basada en características observables en el microscopio estereoscópico cuya identificación no tomase más de un minuto.

Los caracteres empleados fueron: la relación entre la longitud del protórax (LP) y el diámetro de su disco imaginal (DD) en las clases de edad I-II ($LP/DD \leq 0.25$), III-IV ($0.25 \leq LP/DD \leq 0.5$) y V-VI ($LP/DD \geq 0.5$); el engrosamiento y fusión aparente del protórax y del mesotórax en la fase VII-VIII y la aparición de ciertas estructuras queratinizadas en posición mediolateral del metatórax en la fase IX (figura 11). De este modo se crearon categorías homónimas a las de *C. riparius* y en la medida de lo posible también homólogas.



4.1.3. Estudio interpoblacional

Para este estudio sólo se emplearon larvas de *C. riparius*, a diferencia del resto de experimentos, en los que también se utilizaron larvas de *P. olivacea*. Para cada biomarcador molecular o metabólico se congelaron como mínimo 15 larvas. Además, para este estudio interpoblacional, se conservaron en formaldehído al 4%, unos 300 individuos por submuestra (tres submuestras procedentes de las tres estaciones de campo y una procedente del cultivo de laboratorio), para el posterior análisis de deformidades. Las larvas procedentes del cultivo de laboratorio se procesaron de igual modo que las procedentes del campo.

También se tomaron muestras de agua y de sedimento en cada estación, para el análisis químico de sustancias contaminantes. Las muestras se mantuvieron a -20 °C hasta que se realizó el análisis de las sustancias presentes en las mismas, que se llevó a cabo en el Departamento de Química Analítica Aplicada de la Universidad de A Coruña; y que consistió en la determinación cuantitativa de una batería de pesticidas, productos farmacéuticos y de cosmética (PPCPs, del inglés *Pharmaceuticals and Personal Care Products*), metales pesados y fragancias, así como en un análisis cualitativo de sustancias cuyas concentraciones se encontraban por debajo de los límites de cuantificación.

4.1.4. Procedencia del material estudiado

4.1.4.1. Estudio ontogénico y estacional

Para ambos estudios se recogieron larvas de cuarto estadio de *C. riparius* y *P. olivacea* empleando la metodología ya descrita en epígrafes anteriores en el río Sar (Bertamiráns).

Los principales motivos para la elección de esta estación fueron la abundancia de larvas de las dos especies durante casi todo el año, la

proximidad a la Estación de Hidrobioxía Encoro do Con, la facilidad de acceso al punto de muestreo y la vadeabilidad del tramo, al menos en algunas zonas, incluso en época de aguas altas.

Río Sar

El río Sar está situado en la provincia de A Coruña (Galicia, NW España) (figuras 12 y 13). Nace en el NO de la ciudad de Santiago, a 310 metros de altitud y, tras un recorrido de 42 Km, se une al Ulla en la villa de Padrón. Su valle, que se encaja en la Depresión Meridiana -una línea de fracturas que atraviesa Galicia de norte a sur, desde Carballo hasta Tui, y se adentra unos kilómetros en el norte de Portugal- atraviesa una región que se encuentra bajo la influencia climática del Atlántico. En la cuenca predominan las rocas metamórficas e ígneas, salvo la parte final del curso, que está formada por terrenos cuaternarios. En los trabajos de COBO (1988), COBO *ET AL.* (1989), COBO & GONZÁLEZ (1991) y DÍAZ-FIERROS (2000) se describen las particularidades de la cuenca, así como las principales características fisicoquímicas de esta estación.

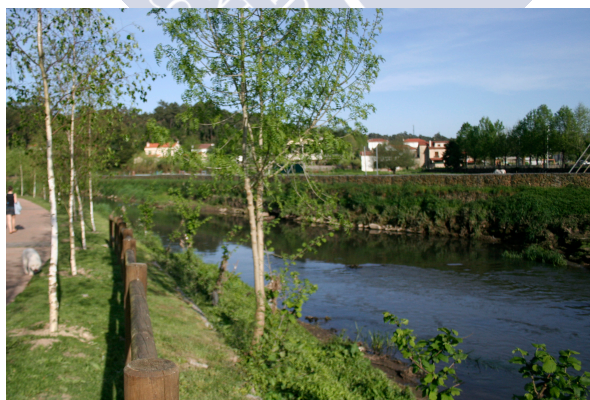


Figura 12. Estación de muestreo en el río Sar a su paso por la localidad de Bertamiráns.

El punto en el que fueron recogidas las muestras se encuentra a 19 km del nacimiento del río y está situado bajo el puente de la carretera que enlaza Bertamiráns con A Condomiña (figuras 10, 12 y 13). Se eligió esta estación por el buen conocimiento que poseemos de sus características, tanto desde el punto de vista fisicoquímico como faunístico.

Cuatro kilómetros aguas arriba se encuentra la estación depuradora municipal de A Silvouta. Esta estación depuradora de aguas residuales (EDAR), inaugurada en 1982, recoge los vertidos urbanos e industriales de Santiago de Compostela. En esta planta se efectúa un tratamiento primario y secundario de los vertidos, aunque su funcionamiento en general es deficiente, hecho que puso de manifiesto COBO (1988), indicando que este tramo del río es uno de los más contaminados de Galicia. Además, DÍAZ-FIERROS (2000) realizó una revisión de la evolución del estado de contaminación de varios puntos del río desde los años setenta (período anterior a la entrada en funcionamiento de la depuradora) hasta la actualidad, y concluye, utilizando los datos de concentraciones de nitratos y fosfatos, únicos datos comunes a todos los años de muestreo, que “hay un mantenimiento en el tiempo, sin avances apreciables, de la contaminación nitrogenada, bien por vertidos orgánicos de origen urbano o probablemente también por la contaminación difusa de origen agrícola”.

4.1.4.2. Estudio interpoblacional

Para la realización de este experimento se emplearon larvas de estadio IV de *C. riparius* procedentes de distintas poblaciones. Debido a la falta de un lugar inalterado en el que hallar larvas de *C. riparius* silvestres en cantidad suficiente como para llevar a cabo este experimento, se tomaron larvas procedentes de un cultivo de laboratorio como control además de de tres poblaciones silvestres correspondientes a los ríos Sar (estación descrita en el epígrafe anterior), Con y Louro. Se trató de seleccionar larvas en un estado de desarrollo intermedio, comprendido entre las fases IV y VI según la clasificación de GODDEERIS ET AL. (2001).

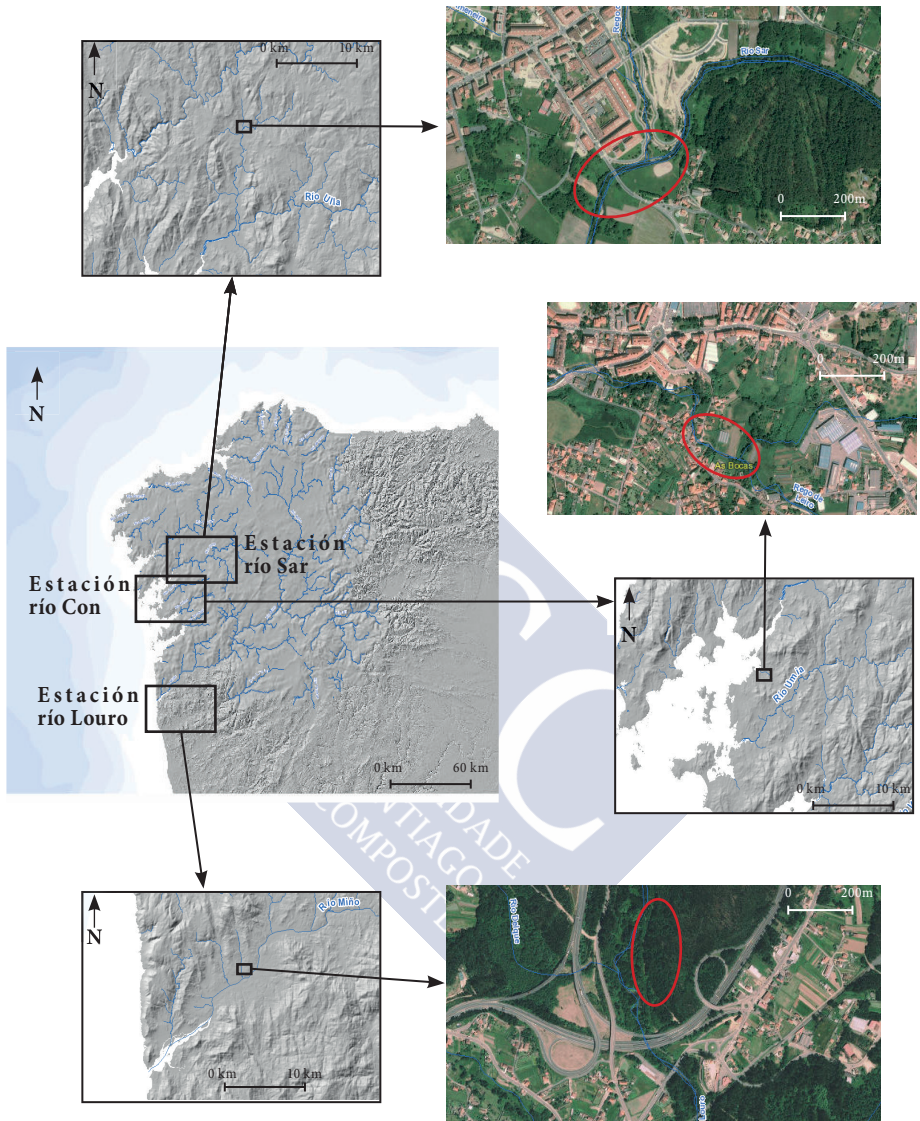


Figura 13. Ubicación de las áreas de muestreo (óvalos rojos) en las tres localidades en las que se capturaron larvas silvestres para esta tesis.

Cultivo de Laboratorio

Las larvas procedentes de cultivo de laboratorio empleadas en este trabajo fueron cedidas por el Grupo de Biología y Toxicología Ambiental de la UNED. Dicho cultivo, procedente de una población natural de *Massamagrell* (Valencia, España, UTM: 30S 728223 4384362), ha sido mantenido de forma permanente durante varios años según las directrices de ensayos de toxicidad (EPA, 2000; OECD, 2004; ASTM, 2010).

El medio de cultivo utilizado fue elaborado a partir de agua destilada y sales minerales en la concentración siguiente: 0.5mM de CaCl_2 , 1 mM de NaCl , 1 mM de MgSO_4 , 0,1 mM de NaHCO_3 , 0.025 mM de KH_2PO_4 y 0.01 mM de FeCl_3 . Además se emplearon alimento para peces en escamas y hojas de ortiga secas y molidas como alimento para las larvas; y tejido de celulosa (aprox. 10 cm² de papel de filtro por bandeja) como material para la síntesis de los tubos larvarios.

El cultivo se mantuvo en una cámara a temperatura constante de 18° C, con periodos de luz/oscuridad de 16/8 horas y con aireación suficiente y permanente, todo lo cual permite una regularidad en su crecimiento y desarrollo.

Río Con

El Con es un río costero de unos 15 km que desemboca en la vertiente sur de la ría de Arousa, provincia de Pontevedra. La estación de muestreo está situada en el Parque da Coca (UTM: 29T 520043E 475571N), en el municipio de Vilagarcía de Arousa (figura 13). Durante el corto recorrido de este río a través de rocas ígneas, principalmente granito y granodioritas, su curso se ve interrumpido por una presa que forma el embalse de Castroagudín, el cual abastece a la ciudad de Vilagarcía de Arousa de agua para consumo humano. En su curso alto y medio discurre principalmente por terreno forestal y agrícola y el curso bajo lo hace, ya en su mayor parte canalizado, a través del núcleo urbano de Vilagarcía. La estación de muestreo está situada aguas arriba de dicho núcleo, donde la contaminación urbana no

es demasiado severa, sin embargo es notable la contaminación agrícola (fitosanitarios, abonos, etc.) e industrial (hidrocarburos, álcalis, ácidos, etc.) procedente de las explotaciones agropecuarias y de las instalaciones industriales situadas aguas arriba de la estación de muestreo. A estas presiones hay que añadir el aporte de cenizas y sustancias de diversa naturaleza originadas en incendios forestales que, en mayor o menor medida, prácticamente cada año afectan a esta cuenca.

Río Louro

El río Louro está situado en la provincia de Pontevedra. Nace en A Serra do Galleiro, a unos 400 m de altitud y desemboca en el río Miño, pocos kilómetros aguas arriba de la localidad de Tui, después de recorrer unos 24 km. La estación de muestreo está situada a 1.4 km aguas arriba de la confluencia con el río Miño (UTM: 29T 530009E 4657720N) (figura 13).

Su curso tiene una orientación Norte-Sur y una trayectoria casi rectilínea a través de un pequeño valle que discurre por el extremo sur de la Depresión Meridiana, la misma por la que lo hace el río Sar, unos 100 km al norte. El valle es disimétrico debido a las rocas predominantes esquistas y granitos. Los primeros, situados en la cara oeste del valle actúan como una superficie de erosión mientras que la ribera occidental granítica, más resistente a la erosión, crea una vertiente con una fuerte pendiente y alturas destacadas.

Este río, aproximadamente hacia la mitad de su recorrido, atraviesa una superficie con muy poca pendiente (2 ‰), donde predominan depósitos de lignito y una capa de arcillas impermeable que junto a la escasa pendiente dió lugar a la formación de un sistema pantanoso de lagunas y turberas llamado Gándaras de Budiño. Este espacio protegido (LIC, red Natura 2000) estaba formado por una serie de charcas y terrenos pantanosos de gran interés biológico por la gran diversidad botánica y ornítica allí presente. Lejos de encontrarse en un buen estado de conservación como cabría esperar por las figuras de protección que lo amparan, este espacio ha sido casi totalmente sustituido por suelo urbano e industrial. SANTOS *ET AL.* (2013) señalan este río como uno de los más contaminados de todo

el tramo internacional del río Miño (UN Economic and Social Council, 2007).

Según los datos de aforos de 1972 a 1984 el caudal absoluto de este río es de 8.44 m³/s que corresponde con un caudal relativo de 55.1 l/s/km². Los coeficientes de caudal muestran un período de aguas altas de diciembre a abril de más de dos veces y media la unidad modular, que contrasta con el mínimo de agosto de 0.11, esta diferencia hace que su coeficiente de irregularidad sea uno de los más altos de Galicia.



4.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

A continuación, se describen brevemente los métodos utilizados para los análisis de los distintos parámetros. Además de éstos, se realizó el cálculo del peso medio por individuo, ya que se necesitaron varios individuos para completar la cantidad de material requerido para cada tipo de análisis.

4.2.1. Análisis de agua y sedimentos

En las tres estaciones de campo se cuantificó la cantidad de materia orgánica presente en los sedimentos y se realizó un análisis de las sustancias presentes en el agua y en los sedimentos, que se llevó a cabo en el Departamento de Química Analítica Aplicada de la Universidad de A Coruña; y que consistió en la determinación cuantitativa de una batería de pesticidas, productos farmacéuticos y cosméticos (PPCPs, del inglés *Pharmaceuticals and Personal Care Products*), metales pesados y fragancias, así como en un análisis cualitativo de sustancias cuyas concentraciones se encontraban por debajo de los límites de cuantificación.

El análisis de los pesticidas se realizó mediante extracción líquido-líquido, empleando cromatografía líquido-sólido para la purificación de los extractos y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) (Thermo Finnigan Polaris Q) para su detección. Las concentraciones de PPCPs en las muestras de sedimento se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas (HPLC/MS) (Applied Biosystem API 3200 y Thermo LTQ Orbitrap), tras la extracción ultrasónica del solvente.

Además se realizó una estima de la cantidad de materia orgánica presente en los sedimentos de cada estación de campo. Para ello se dejó secar aproximadamente 0.5 kg de sedimentos de cada estación durante 48 horas a temperatura ambiente. Una vez secas las muestras, se tomaron tres fracciones de cada una, se pesaron y se calcinaron en un horno mufla a 450 °C durante 4 horas. Se dejaron enfriar durante 10 minutos y se volvieron

a pesar. La diferencia de peso obtenida se corresponde con el material calcinado: la materia orgánica. Los valores resultantes se transformaron en porcentajes para poder comparar los valores de las distintas estaciones.

4.2.2. Indicadores Metabólicos

4.2.2.1. Extracción y determinación de glucógeno

La extracción de glucógeno se realizó, en todos los casos, a través del una lisis con álcali fuerte y la determinación se llevó a cabo mediante el método colorimétrico de la antrona (VAN HANDEL, 1965). A continuación se describe el proceso.

- Se pasaron las larvas de un criovial a un tubo de 1.5 ml y se homogenizaron en seco mientras aún estaban semicongeladas.
- Se añadieron 0.25 ml de agua y se homogeneizó de nuevo. Si se procesaban varias muestras a la vez, las ya homogeneizadas se mantuvieron en medio frío para evitar la degradación del glucógeno en este punto y se añadieron otros 0.25 ml de KOH al 60 % y se calentaron a baño María durante 15 min.
- Se enfriaron a temperatura ambiente durante unos dos minutos. Después a la muestra digerida se le añadieron 50 µl sulfato sódico y 1 ml de etanol al 80 % a una temperatura de -20 °C, se agitaron y se dejaron reposar.
- Una vez precipitado el glucógeno, se centrifugaron durante 20 min a 3.000 g. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 0.5 ml de agua destilada, se volvió a precipitar el glucógeno con 1 ml etanol a -20 °C, se eliminó el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se dejaron secar toda la noche (al menos 12 h) a 30 °C.

- Entre 12 y 15 horas después, el glucógeno, que en este punto estará seco, en forma de fino polvo blanco, se disolvió de nuevo, en 0.5 ml de agua destilada.
- De la disolución anterior y de los patrones se tomaron al menos dos alícuotas de 50 μ l y se mezclan con 1.5 ml de reactivo de antrona cada una. El reactivo ha sido previamente preparado diluyendo antrona al 0.15 % en ácido sulfúrico al 70 %. Las disoluciones patrón se realizaron mediante diluciones seriadas glucógeno tipo VIII de *Crepidula fornicata* Lamarck, 1799 (Sigma).
- Se incuban todas las réplicas, patrones y blancos en un termorreactor a 90 °C durante 20 min, después se dejan enfriar las muestras en un baño de agua-hielo durante 5 min.
- Finalmente se determina la cantidad de glucógeno midiendo la absorbancia de las muestras, un control de agua destilada y las disoluciones patrón a una longitud de onda de 620 nm. Para ello se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible de cubeta modelo UVI-1002E de Thermo Electron Corporation, England.
- Para conocer la cantidad total de glucógeno por gramo de peso fresco de muestra se multiplicó la concentración ofrecida por el espectrofotómetro por el volumen en el que se había diluido el glucógeno purificado y el resultado se dividió entre el peso fresco de la muestra, según la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad total de Glucógeno} = (R1 + R2 + R3) \times \text{Vol} \times \text{Dil}$$

Donde:

-R1, R2, R3 y son las réplicas técnicas realizadas de la cuantificación de glucógeno

-Vol es el volumen en el que se ha diluido el glucógeno seco.

-Dil es el factor de dilución empleado en aquellas muestras cuya concentración sobrepasó el límite superior de detección.

Una vez hallada la cantidad total de glucógeno de la muestra se dividió el valor obtenido por el peso fresco en gramos de la muestra inicial, para así obtener el contenido de glucógeno expresado en mg/g de muestra

4.2.2.2. Extracción y determinación de proteínas

La extracción y determinación de proteínas totales empleando el método descrito por BARCA (2015). A continuación se describe el proceso.

- Para la extracción de proteínas, las larvas, todavía congeladas, se homogeneizaron en 750 μ l tampón de buffer de lisis: 720 μ l de buffer TRIS-EDTA (40mM TRIS, pH 7.8 1mM EDTA) y 30 μ l de inhibidor de proteasas cComplete EDTA-free (Roche) a una concentración 20x.
- Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 500g y a 4 °C. Se recogieron los sobrenadantes y se volvieron a centrifugar 30 min a 12000g a 4 °C. Acto seguido se congelaron las muestras a -80° C hasta el momento de la cuantificación.
- Para medir la concentración de proteínas totales se usó el kit comercial BCA Protein Assay Reagent basado en la reacción del ácido bicinconínico (BCA) con cationes de cobre (Cu⁺) para formar un complejo que muestra un incremento lineal de la absorbancia a 562 nm proporcional al aumento en la concentración de proteínas. En este proceso se utilizaron alícuotas de 25 μ l de muestra a los que se le añaden 200 μ l del reactivo de trabajo, previamente preparado mediante la mezcla de las dos soluciones suministradas por la casa comercial en proporción 50:1 (50 partes de reactivo A por cada parte de reactivo B).
- Para la elaboración de la recta patrón se realizaron diluciones seriadas de la disolución suministrada en el kit, albúmina de suero bovino con una concentración de 1mg/ml. Se depositaron tres alícuotas de cada muestra y cinco de cada disolución patrón en una placa de 96 pocillos.
- A todos ellos, muestras y patrones, se les añadieron 200 μ l del reactivo de trabajo y se rellenaron otros tres pocillos sólo con reactivo de

trabajo para los blancos, tal y como se detalla en el protocolo del kit.

- Las placas se taparon y se agitaron durante 30 s y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Después se dejaron enfriar 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia, las concentraciones se hallaron por interpolación y el contenido de proteínas por unidad de masa de muestra inicial se halló aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de proteínas totales} = (R1 + R2 + R3) \times \text{Vol} \times \text{Dil}$$

Donde:

-*R1, R2, R3* y son las réplicas técnicas realizadas de la cuantificación de proteínas

-*Vol* es el volumen que se ha obtenido después de la primera centrifugación del proceso de extracción.

-*Dil* es el factor de dilución empleado en aquellas muestras cuya concentración sobrepasó el límite superior de detección.

La medición de la absorbancia se llevó a cabo en un espectrofotómetro NANODrop 1000.

Una vez hallada la cantidad total de proteínas de la muestra se dividió el valor obtenido por el peso fresco en gramos de la muestra inicial, para así obtener el contenido de proteínas expresado en mg/g de muestra.

4.2.2.3. Extracción de ácidos nucleicos y determinación de la relación RNA/DNA

Los ácidos nucleicos son macromoléculas que se encuentran tanto en el núcleo como en el citoplasma celular. Debido a ello, para su purificación es necesario digerir previamente las membranas citoplasmáticas y nucleares. Para extraer los ácidos nucleicos del material biológico es necesario provocar la lisis celular, inactivar las nucleasas celulares y separar los ácidos nucleicos de los restos de células.

El procedimiento de lisis idóneo suele consistir en un equilibrio de técnicas y ha de ser suficientemente fuerte para romper el tejido, pero suficientemente suave para preservar los ácidos nucleicos. Entre los procedimientos de lisis más usuales figura la rotura mecánica (trititación, lisis hipotónica). Tras la lisis celular y la inactivación de las nucleasas, los restos de células se eliminan fácilmente por filtración o precipitación.

El método clásico de purificación de los ácidos nucleicos se basa en el uso de disolventes orgánicos, siendo la extracción mediante fenol/cloroformo la más conocida. La clave de la purificación del RNA radica en evitar su degradación por acción de las ribonucleasas presentes en las células, de manera que todos los protocolos existentes se basan en la rápida inactivación de estas enzimas.

En este estudio hemos empleado un método de extracción fenólica con TRIzol (TRIzol® Reagent Invitrogen™ Life Technologies) ya que el uso de este reactivo permite realizar la extracción simultánea del RNA y DNA presente en las muestras.

Fundamento

La extracción fenólica se basa en el hecho que los ácidos nucleicos son menos solubles en solventes orgánicos que en soluciones acuosas. El principio básico de esta extracción es la desproteínización del homogeneizado

celular y la eliminación de los componentes que no son hidrosolubles a través de una separación en dos fases con distinta naturaleza.

El TRIzol es un reactivo que se utiliza en el aislamiento de RNA total de alta calidad a partir de muestras de células y tejidos de origen animal, vegetal, levaduras o bacteriano dentro de un corto período de tiempo. Además, permite realizar la precipitación secuencial de RNA, DNA y proteínas a partir de una sola muestra (CHOMCZYNSKI, 1993). Este reactivo también permite procesar de manera simultánea varias muestras, y constituye una mejora del método de aislamiento de RNA de un solo paso desarrollado por CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987).

Durante la homogeneización de la muestra con el TRIzol, se mantiene la integridad del RNA, al mismo tiempo que se altera la estabilidad de las células, se disuelven los componentes celulares y se inactiva, de manera altamente eficaz, la actividad de las enzimas RNAasas. Después de la homogeneización, la adición de cloroformo seguida de centrifugación separa la muestra en dos fases, una de ellas acuosa (superior) y la otra orgánica (inferior), permaneciendo exclusivamente el RNA en la fase acuosa y las proteínas desnaturizadas y el DNA en la fase orgánica e interfase. En esta separación, se utiliza el fenol en combinación con el cloroformo para aumentar la eficacia de la extracción, ya que la alta densidad que presenta el cloroformo y su capacidad de disolver los lípidos y las proteínas proporciona fases acuosas menos contaminadas (HERNÁNDEZ *ET AL.*, 1994).

Una vez que la fase acuosa es aislada, se pasa a purificar progresivamente el RNA que contiene, a través de precipitaciones a baja temperatura con alcoholes y centrifugaciones secuenciales, produciéndose así un precipitado que cada vez está más libre de contaminantes (polisacáridos, sales, etc.).

El DNA es recuperado por precipitaciones secuenciales de la fase orgánica.

Preparación de las muestras

Homogeneización y lisis celular

- Las muestras previamente congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se descongelaron y se pesaron en una balanza de precisión (Denver TP-214). Se tomaron entre 3 y 5 larvas, se homogenizaron con la ayuda de un homogeneizador (VWR™ Disposable Pellet Mixers).
- Seguidamente se añadieron 250 μl de TRIzol a cada muestra y se homogenizaron de nuevo, volviendo a añadirle otros 250 μl de TRIzol una vez finalizado este paso. De esta manera, se obtuvo una solución acuosa en la que se encontraban los ácidos nucleicos. Todo este proceso se llevó a cabo manteniendo las muestras en frío para una mejor conservación del RNA.
- A continuación se procedió a centrifugar las muestras durante 10 minutos a 12000 g y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una centrífuga Digicen20-R, paso que eliminó los restos celulares, decantándose después el sobrenadante que contenía el RNA a otro tubo.

Separación en fases

- Para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos se incubó el sobrenadante durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- El siguiente paso consistió en agregar 100 μl de cloroformo y agitar vigorosamente las muestras a mano (≈ 15 segundos), dejándolas incubar de nuevo otros 2-3 minutos a temperatura ambiente. En este punto las muestras presentaban un color rosáceo y una consistencia relativamente espesa.
- Posteriormente, se procedió a centrifugarlas durante 15 minutos a 12000 g y a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, paso que permitió separar las muestras en dos fases; una fase superior incolora, la acuosa, en la que permanecía exclusivamente el RNA, y una fase inferior de color rosáceo, que correspondía a la fase orgánica de fenol-cloroformo.

Entre ambas aparecía una pequeña interfase blanquecina.

- A continuación, se retiró la fase acuosa que contenía el RNA sin tocar la fase orgánica y se dispensó en un tubo limpio previamente etiquetado, reservando la fase orgánica en la nevera durante toda la noche para proceder a la extracción del DNA al día siguiente.

Extracción del RNA

- Precipitación del RNA. Para llevar a cabo la precipitación del RNA se le añadieron 250 μl de isopropanol a la fase acuosa y se agitó suavemente a mano durante 15 segundos. A continuación se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 15 minutos a 12000 g y 4 °C. En este momento el RNA precipitado era visible en el fondo de los tubos. Llegados a este punto, se procedió a realizar el lavado del RNA extraído para eliminar cualquier impureza que pudiera quedar en las muestras.

Lavado del RNA

- En primer lugar se eliminó el sobrenadante de las muestras dejando solamente el precipitado de RNA en el tubo. A continuación se procedió a lavarlo con 500 μl etanol al 70 % frío (-20 °C). Para ello, se agitaron brevemente los tubos con un vórtex VELP Scientifica para levantar el precipitado. Seguidamente se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 10000 g manteniendo la temperatura a 4 °C y se decantó el sobrenadante.
- Para que la cuantificación del RNA fuera lo más exacta posible, al finalizar el lavado de las muestras, estas se centrifugaron brevemente para retirar los restos de etanol que pudieran quedar, y se dejaron secar con el tubo abierto a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Resuspensión del RNA

- Las muestras de RNA extraídas se disolvieron en 70 μ l de agua tratada con DEPC (dietilpircarbonato) mediante un breve centrifugado, y se incubaron en un baño de agua a 55-60 °C durante 10 minutos.
- El DEPC es un agente alquilante que reacciona de modo covalente e inespecífico con las proteínas, y además es muy reactivo con los lugares activos de las ribonucleasas, inactivándolas eficazmente.

Tratamiento del RNA extraído con DNAasas y cuantificación

- Para eliminar cualquier DNA residual de las muestras se trataron con desoxirribonucleasa I mediante el “RNase-Free DNase Set” (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Así, en primer lugar se preparó la mezcla de reacción, formada por 50 μ l de la muestra de RNA extraído, 10 μ l de tampón 10x y 1 μ l de DNAasa.
- A continuación, se incubó esta mezcla en una estufa a 37 °C durante 90 minutos, y finalizado este período se inactivó la enzima manteniendo las muestras a 70 °C durante 15 minutos.
- A partir de este momento se realizaron varias fenolizaciones para retirar la enzima, para ello, inicialmente, se le añadió a las muestras 100 μ l de agua tratada con DEPC y 200 μ l de fenol:cloroformo:isoamílico. Después, se centrifugaron durante 15 minutos a 10000 g y a una temperatura de 4 °C, y se tomó la fase acuosa para añadirse a un tubo Phase lock gel (5PRIME). Llegados a este punto, se añadió un volumen de 200 μ l de cloroformo a cada tubo y se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 12000 g y 4 °C. Por último se retiró el sobrenadante donde se encontraba el RNA extraído y se midió el volumen mediante pipeteo.
- La cantidad de RNA se cuantificó mediante fluorimetría en un fluorímetro Qubit 2.0 Invitrogen (Life technologies) y se realizaron los cálculos necesarios para conocer la cantidad de RNA extraída en cada muestra.

Extracción del DNA

- Para llevar a cabo esta parte del protocolo, se recuperó la muestra de la fase de fenol-cloroformo que se había guardado en la nevera el día anterior y se procedió a precipitar el DNA que contenía.

Precipitación del DNA

- El primer paso consistió en eliminar, en la medida de lo posible, cualquier resto de fase acuosa que pudiera quedar sobre la interfase blanquecina de las muestras. Este es un paso fundamental en la extracción del DNA. Seguidamente, se añadieron 150 μl de etanol al 100 % a los tubos con la fase orgánica. Se mezclaron con suavidad por inversión varias veces y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos. A continuación, se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 g y 4 °C con el objetivo de precipitar el DNA, y se eliminó el sobrenadante de fenol-etanol en el que se encontraban las proteínas. Se procedió entonces, a realizar los lavados del precipitado de DNA de las muestras para eliminar las impurezas.

Lavados del DNA

- Se añadieron a las muestras 500 μl de una solución que contenía citrato sódico 0.1 M y etanol al 10 %, se dejaron incubar 30 minutos a temperatura ambiente, mezclándolas con movimientos suaves cada 10 minutos aproximadamente, y se centrifugaron 5 minutos a 2000 g. Finalmente, se eliminó el sobrenadante de los tubo y se repitió este lavado un par de veces más.
- Finalizados los lavados, se procedió a añadirle a las muestras 1 ml de etanol frío al 70 % y se incubaron durante media hora a temperatura ambiente. Durante este tiempo, se llevó a cabo la mezcla del contenido de los tubos cada 10 minutos, mediante una suave inversión de los

mismos. Seguidamente, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 5000 g, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado de DNA a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Resuspensión del DNA

- La resuspensión de las muestras de DNA se llevó a cabo con 75 µl de tampón TE (Tris 40 mM-EDTA 1 mM), con el objetivo de solubilizar el precipitado de DNA mientras se protege de su degradación.

Tratamiento del DNA extraído con RNAasas libres de DNAasas y cuantificación

- Para eliminar cualquier resto de RNA que pudiera quedar, se añadieron 0.5 µl de RNAasa a los tubos y se incubaron durante 45 minutos a 37 °C en una estufa. Posteriormente, se volvieron a incubar otros 45 minutos, pero en este caso, a una temperatura de 70 °C para inactivar la enzima y disolver el DNA, dejándolo a continuación 15 minutos a temperatura ambiente.
- Finalmente, se cuantificó la cantidad de DNA de las muestras en un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 Thermo Scientific) a una longitud de onda de 620 nm, y se realizaron las operaciones necesarias para obtener la cantidad de DNA extraída en cada muestra.
- Una vez cuantificadas las cantidades de RNA y DNA de los tejidos, se llevaron a cabo los cálculos pertinentes para obtener la relación RNA/DNA objeto de estudio.

Error de medida, interferencias analíticas y criterios de selección de la metodología de cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofluorimetría y espectrofotometría.

Con el incremento del uso de la relación RNA/DNA para la evaluación del estado nutricional en distintos organismos, han aumentado también el número de métodos analíticos para la determinación de estos ácidos nucleicos. El primer protocolo publicado estaba basado en técnicas espectrofotométricas (SCHMIDT & THANNHAUSER, 1945) más tarde modificado por MUNRO & FLECK (1966) y adaptado por BUCKLEY (1979). Las metodologías más recientes se basan en el aumento de la fluorescencia de los fluoróforos al unirse específicamente a los ácidos nucleicos. La principal ventaja de estas nuevas técnicas es el aumento sustancial de la sensibilidad y el rendimiento de la muestra en comparación con los métodos espectrofotométricos. La estimación de las concentraciones de ácidos nucleicos está influida en gran medida por factores tales como la disociación de proteínas, los patrones, los fluoróforos utilizados, etc. (CALDARONE & BUCKLEY 1991; CLEMMESSEN 1993; CANINO & CALDARONE 1995; BERDALET *ET AL.*, 2005 A, B). En consecuencia las diferencias metodológicas de extracción y de cuantificación han imposibilitado a los investigadores comparar directamente sus resultados. Muestra de ello es el estudio de intercalibración llevado a cabo por CALDARONE *ET AL.* (2006) en el que se calculó la relación RNA/DNA en 4 laboratorios distintos, mostrando sus resultados diferencias significativas entre ellos.

DELL'ANNO *ET AL.* (1998) compararon la cuantificación de ácidos nucleicos en muestras de sedimentos marinos mediante tres métodos: HPLC, espectrofotometría y fluorescencia. No encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos mediante HPLC y espectrofotometría, sin embargo surgieron algunos problemas de subestimación en la cuantificación de DNA eucariota mediante fluorescencia ligados, según los autores, a procesos de desnaturalización

del DNA durante la extracción, purificación y cuantificación. Además, encontraron ciertas incongruencias en la cuantificación del RNA mediante fluorimetría y espectrofotometría, debidos a que en ambos casos fue calculado por diferencia, esto es, se estimó la cantidad total de ácidos nucleicos y a esta se le restó la cantidad de DNA. Así, estos autores subrayan que el análisis independiente de RNA y DNA de la misma muestra ofrece resultados más fiables en la cuantificación.

ESTEVESES *ET AL.* (2000) analizaron el contenido de RNA y DNA y la relación RNA/DNA en larvas de góbidos mediante dos métodos fluorométricos para la extracción y cuantificación de ácidos nucleicos y compararon los resultados obtenidos. En ambos métodos se cuantificó directamente la cantidad de ácidos nucleicos totales y la de DNA, la diferencia entre métodos eran dos pasos de purificación con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico. Concluyeron que las diferencias entre las estimaciones del contenido de ácidos nucleicos y de la relación RNA/DNA de larvas eran evidentes y que variaban según el procedimiento utilizado, los métodos con mayor esfuerzo de purificación proporcionan resultados más precisos.

WEBER *ET AL.* (2003) hallaron la solución a la fluorescencia endógena propia de las muestras y que sesgaba sus resultados al utilizar técnicas fluorométricas: las sustancias que producen dicha fluorescencia se pueden eliminar de forma fiable mediante la simple precipitación de las muestras con isopropanol.

En este trabajo se empleó el método del TRIZol® para la extracción de RNA y DNA, una técnica basada en la utilización de isocianato de guanidina y cuyo protocolo hemos detallado anteriormente. Se eligió este método, más laborioso y lento que los kits de extracción comerciales -aunque también más eficiente-, ya que permite extraer ambos ácidos nucleicos de una misma muestra; requisito indispensable para el cálculo correcto de la relación RNA/DNA. El planteamiento inicial era realizar

la cuantificación de los purificados de ambos ácidos nucleicos mediante espectrofotometría, en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 Thermo Scientific, empleando una pequeña alícuota (1.5 - 2µl) de extracción para cada una de las réplicas de medida. Este método nos permitiría además conservar los extractos purificados de ambos ácidos nucleicos para su utilización en posibles estudios ulteriores (expresión génica, genética de poblaciones, etc.).

Durante la realización de las determinaciones espectrofotométricas del RNA, detectamos que los valores de RNA obtenidos eran muy elevados, lo que hacía que la relación RNA/DNA mostrase valores alejados de los hallados en la bibliografía para diferentes especies; incluso el blanco, que no contenía RNA, presentaba valores elevados de este ácido nucleico según las cuantificaciones realizadas.

Esto nos llevó a pensar en la existencia de contaminación por fenoles (que se utilizan en las diferentes fenolizaciones de las muestras para retirar la enzima DNAasa) y por proteínas, que no eran retenidos totalmente por el gel de los tubos Phase Lock Gel™ 5 PRIME, empleados específicamente para retirar la fase orgánica tras la última fenolización. Además, los valores de pureza que el NanoDrop® proporciona -relación de absorbancias a 260 y 280 nm- resultaron ser notablemente inferiores a 2. Una relación 260/280 de ~2.0 se acepta generalmente como “puro” para RNA (según el manual de utilización del propio NanoDrop®). Una relación considerablemente inferior puede ser indicativa de la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes con alta absorbancia a 280 nm o cerca de esta longitud de onda.

Ante esta situación se realizaron pruebas con patrones de RNA procedente de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (SIGMA Life Science) y DNA procedente de timo de ternera (SIGMA Life Science) para comprobar la fiabilidad de las medidas en el espectrofotómetro NanoDrop® y, como alternativa, un fluorímetro (Qubit 2.0 de Invitrogen (Life technologies)).

Dichas pruebas constaron de tres ensayos distintos: el primero con concentraciones conocidas de RNA y DNA diluidos en tampón, en tubos separados y sin tratamiento; el segundo con patrones de ambos ácidos nucleicos en tubos separados y tratados del mismo modo que las muestras y el último con concentraciones de RNA y DNA conocidas en el mismo tubo que fueron tratados del mismo modo que las muestras.

En el primer ensayo se midieron patrones de RNA y DNA sin tratar, con concentraciones de 0, 5 y 10 ng/μl para el RNA y de 0, 10, 50, 100, 150 y 200 ng/μl de DNA, haciendo nueve medidas de cada una de ellas tanto en el espectrofotómetro como en el fluorímetro, calculando en cada caso la media, el error absoluto (diferencia entre el valor de la medida y el valor de la concentración del patrón) y el porcentaje de error (que se obtiene al multiplicar por cien el cociente del error absoluto y el valor de la concentración real) (tabla 4).

En este caso pudimos comprobar que al no ser tratadas las muestras con TRIzol®, enzimas y fenol, los resultados de las medidas de los patrones tanto de DNA como de RNA estaban próximas a la concentración del patrón disuelto en el tampón y por lo tanto el espectrofotómetro como el fluorímetro estaban midiendo bien. De ello se deduce que el procedimiento de extracción pudiera estar interfiriendo en los resultados.

En el segundo ensayo se midieron los patrones de RNA y DNA por separado sometidos al mismo tratamiento que las muestras. En este caso 0.5 y 10 ng/μl de RNA y 0, 10, 50, 100, 150 y 200 ng/μl de DNA, haciendo nueve medidas de cada uno de ellos en el espectrofotómetro así como en el fluorímetro, calculando de nuevo la media, el error absoluto y el porcentaje de error (tabla 5).

En esta ocasión los valores obtenidos en el espectrofotómetro para el RNA eran siempre los mismos con muy poca variación, independientemente de la concentración de patrón utilizada, y muy superiores a su concentración real. Sin embargo, las medidas de RNA obtenidas en el fluorímetro

Tabla 4. Media, error absoluto y porcentaje de error de los patrones de DNA y RNA sin tratamiento con reactivos.

	Concentración	Método	Media	Error Absoluto	% Error
Tampón + RNA	[RNA]: 5 ng/μl	Espectrofotometría	3.4 ng/μl	-1.6	-32.0
		Espectrofluorometría	3.7 ng/μl	-1.3	-26.0
	[RNA]: 10 ng/μl	Espectrofotometría	7.5 ng/μl	-2.5	-25.0
		Espectrofluorometría	8.6 ng/μl	-1.4	-14.0
Tampón + DNA	[DNA]: 10 ng/μl	Espectrofotometría	7 ng/μl	-3.0	-30.0
		Espectrofluorometría	13.2 ng/μl	3.2	32.0
	[DNA]: 50 ng/μl	Espectrofotometría	35.6 ng/μl	-14.4	-28.8
		Espectrofluorometría	66.1 ng/μl	16.1	32.2
	[DNA]: 100 ng/μl	Espectrofotometría	82.9 ng/μl	-17.1	-17.1
		Espectrofluorometría	127.4 ng/μl	27.4	27.4
	[DNA]: 150 ng/μl	Espectrofotometría	136.7 ng/μl	-13.3	-8.9
		Espectrofluorometría	182.3 ng/μl	32.3	21.5
	[DNA]: 200 ng/μl	Espectrofotometría	182.1 ng/μl	-17.9	-9.0
		Espectrofluorometría	226.1 ng/μl	26.1	13.1

presentaban una pequeña subestimación, inversamente proporcional a la concentración del patrón.

Por último se sometieron al proceso de extracción los patrones de RNA y DNA juntos, con diferentes concentraciones de cada uno de ellos tal y como se muestra en tabla 6, tratándolos como el resto de las muestras analizadas. Se midieron en el espectrofotómetro así como en el fluorímetro, calculando la media, el error absoluto y el porcentaje de error en cada caso.

Tabla 5. Media, error absoluto y porcentaje de error de los patrones de DNA y RNA tratados del mismo modo que las muestras.

Concentración		Método	Media	Error Absoluto	% Error
Tampón + RNA	[RNA]: 0 ng/μl	Espectrofotometría	1739 ng/μl	----	----
		Espectrofluorometría	<0.02 ng/μl	0.0	0.0
	[RNA]: 5 ng/μl	Espectrofotometría	1612 ng/μl	----	----
		Espectrofluorometría	4.4 ng/μl	-0.6	-12.0
	[RNA]: 10 ng/μl	Espectrofotometría	1694 ng/μl	----	----
		Espectrofluorometría	9.9 ng/μl	-0.1	-1.0
Tampón + DNA	[DNA]: 10 ng/μl	Espectrofotometría	8.3 ng/μl	-1.7	-17.0
		Espectrofluorometría	1.4 ng/μl	-8.6	-86.0
	[DNA]: 50 ng/μl	Espectrofotometría	44.2 ng/μl	-5.4	-11.6
		Espectrofluorometría	16.4 ng/μl	-33.6	-67.2
	[DNA]: 100 ng/μl	Espectrofotometría	90 ng/μl	-10.0	-10.0
		Espectrofluorometría	28.4 ng/μl	-71.6	-71.6
	[DNA]: 150 ng/μl	Espectrofotometría	142.2 ng/μl	-7.8	-5.2
		Espectrofluorometría	39.8 ng/μl	-110.2	-73.5
	[DNA]: 200 ng/μl	Espectrofotometría	188.8 ng/μl	-11.2	-5.6
		Espectrofluorometría	75.7 ng/μl	-124.3	-62.2

Los resultados de las cuantificaciones de RNA realizadas en el espectrofotómetro fueron similares a los del anterior ensayo, en el que los patrones se procesaron por separado, mostrando una clara sobreestimación; mientras que las medidas realizadas con el fluorímetro presentaban ligeras subestimaciones de la concentración del patrón (tabla 6).

Tabla 6. Medidas de las concentraciones de los patrones de RNA y DNA utilizados en el ensayo de calibración del método de cuantificación de la relación RNA/DNA. EFT: espectrofotometría; EFL: espectrofluorimetría.

Concentración		Método	Media	Error	% Error	Media	Error	% Error
[RNA]	[DNA]		DNA	absoluto	DNA	RNA	absoluto	RNA
(ng/μl)	(ng/μl)		(ng/μl)	DNA		(ng/μl)	RNA	RNA
0	0	EFT	<0.01	0.0	0.0	1705.1	----	----
		EFL	<0.01	0.0	0.0	<0.02	0.0	0.0
0	10	EFT	8.3	-1.7	-17.0	1622.6	----	----
		EFL	0.86	-9.4	-94.0	<0.02	0.0	0.0
10	0	EFT	0.1	0.1	0.0	1616.6	----	----
		EFL	<0.01	0.0	0.0	7.6	-2.4	-24.0
10	10	EFT	8.0	-2.0	-20.0	1536.2	----	----
		EFL	1.3	-8.7	-87.0	8.1	-1.9	-19.0
0	50	EFT	43.7	-6.3	-12.6	1541.6	----	----
		EFL	22.4	-27.6	-55.2	<0.02	0.0	0.0
10	50	EFT	45.9	-4.1	-8.2	1496.8	----	----
		EFL	18.3	-31.7	-63.4	7.9	-2.1	-21.0
0	100	EFT	88.5	-11.5	-11.5	1587.4	----	----
		EFL	30.3	-69.7	-69.7	<0.02	0.0	0.0
10	100	EFT	92.0	-8.0	-8.0	1467.8	----	----
		EFL	31.3	-68.7	-68.7	8.0	-2.0	-20.0
0	150	EFT	142.7	-7.3	-4.9	1569.1	----	----
		EFL	57.3	-92.7	-61.8	<0.02	0.0	0.0
10	150	EFT	144.1	-5.9	-3.9	1764.7	----	----
		EFL	53.2	-96.8	-64.5	8.2	-1.8	-18.0
0	200	EFT	185.6	-14.4	-7.2	1516.8	----	----
		EFL	78.2	-121.8	-60.9	<0.02	0.0	0.0
10	200	EFT	191.4	-8.6	-4.3	1673.1	----	----
		EFL	79.1	-120.9	-60.5	8.1	-1.9	-19.0
25	250	EFT	241.4	-8.6	-3.4	1666.3	----	----
		EFL	123.5	-126.5	-50.6	20.8	-4.2	-16.8
50	300	EFT	290.8	-9.2	-3.1	1714.2	----	----
		EFL	162.4	-137.6	-45.9	43.6	-6.4	-12.8
75	350	EFT	343.1	-6.9	-2	1698.6	----	----
		EFL	206.4	-143.6	-41.0	67.4	7.6	-10.1
100	400	EFT	391.7	-8.3	-2.1	1887.7	----	----
		EFL	268.4	-131.6	-32.9	91.0	-9.0	-9.0
200	450	EFT	443.2	-6.8	-1.5	1503.2	----	----
		EFL	301.3	-148.7	-33	188.6	-11.4	-5.7
300	500	EFT	490.5	-9.5	-1.9	1863.3	----	----
		EFL	367.1	-132.9	-26.6	289.2	-10.8	-3.6

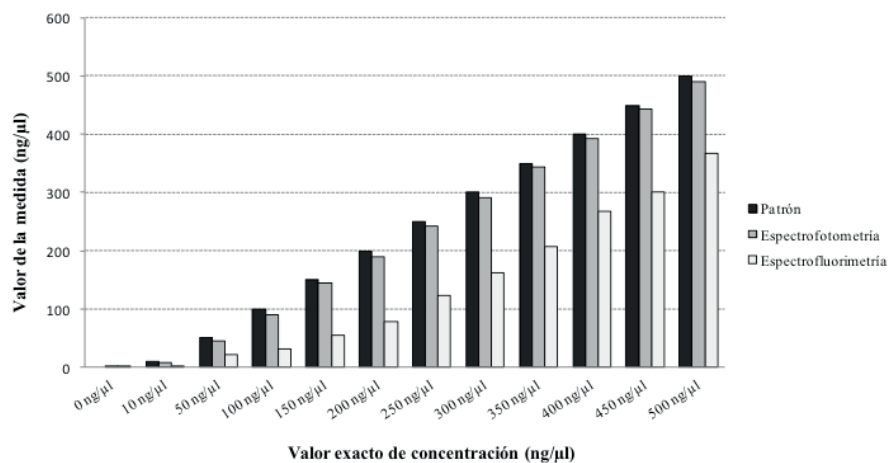


Figura 14. Representación de los valores de concentración real de los patrones de DNA y los valores obtenidos mediante la cuantificación de los mismos por espectrofotometría y espectrofluorimetría.

Las medidas del DNA procesadas de esta manera mostraron unos valores próximos, aunque algo inferiores, a la concentración del patrón cuando se midieron con el espectrofotómetro, mientras que en comparación las concentraciones medidas con el fluorímetro estaban muy por debajo de la concentración del patrón utilizado.

En función de los resultados obtenidos, para calcular de forma correcta la relación RNA/DNA, decidimos utilizar el espectrofotómetro para la determinación de DNA en las muestras, ya que la desviación de la medida de este ácido nucleico con respecto a la concentración de patrón es menor que la desviación hallada cuando las medidas se realizan con el fluorímetro (figura 14).

Por el contrario, para cuantificar el RNA, decidimos utilizar el fluorímetro ya que los valores de las concentraciones encontradas fueron similares a las esperadas, mientras que las obtenidas con el espectrofotómetro distaron de mucho la concentración real de los patrones (figura 15).

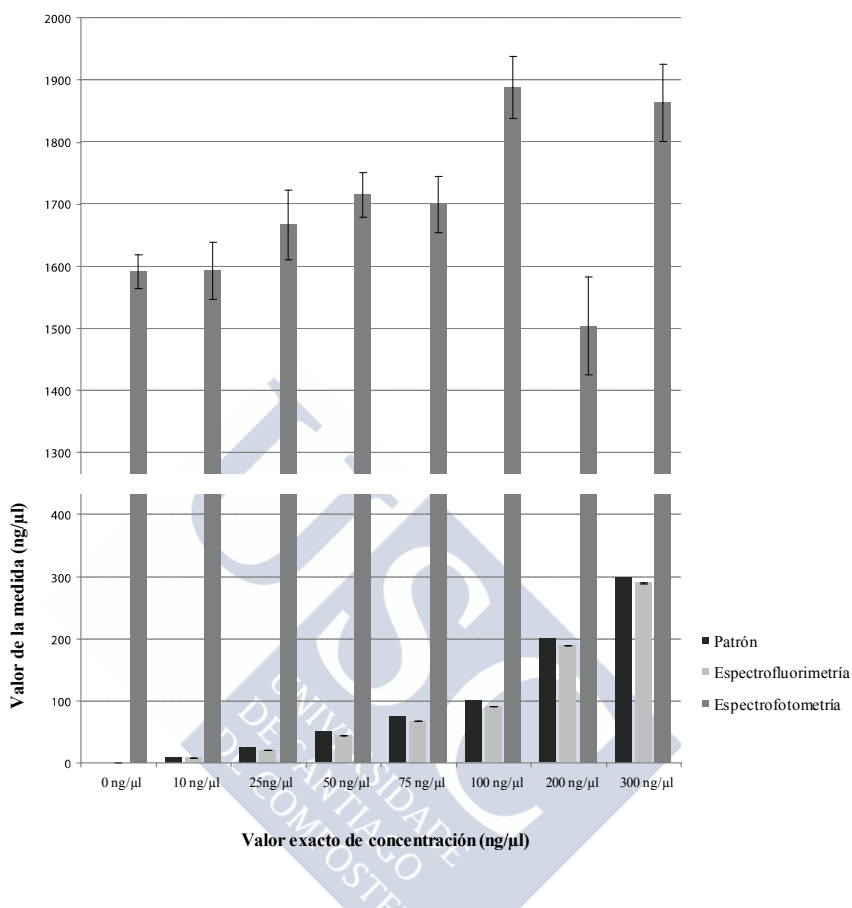


Figura 15. Representación de los valores de concentración real de los patrones de RNA y los valores obtenidos mediante la cuantificación de los mismos por espectrofotometría y espectrofluorimetría.

Con los datos de concentración de los patrones y los porcentajes de error de cuantificación observados en este último ensayo se realizaron dos regresiones, una para el DNA (figura 16) y otra para el RNA (figura 17). Las ecuaciones obtenidas mostraron un R^2 elevado y por consiguiente se emplearon para el cálculo final de la concentración de las muestras, aplicándose a los valores ofrecidos por el espectrofotómetro al cuantificar el DNA y por el fluorímetro al cuantificar el RNA.

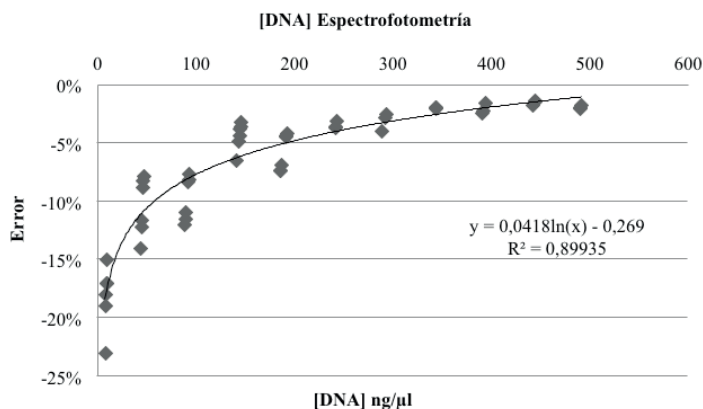


Figura 16. Regresión que relaciona las concentraciones de las disoluciones de DNA empleadas como patrones y el porcentaje de error de medida por espectrofotometría.

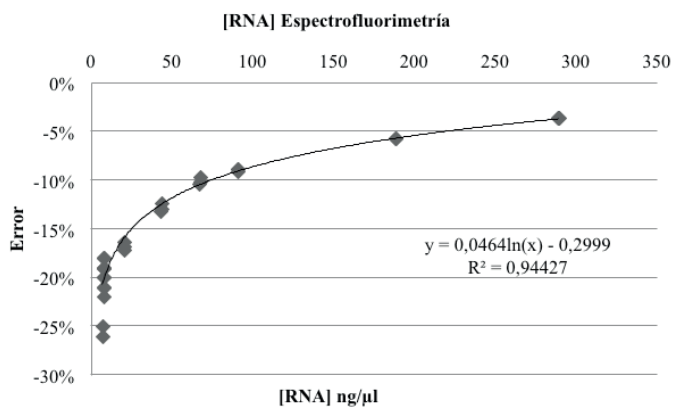


Figura 17. Regresión que relaciona las concentraciones de las disoluciones de RNA empleadas como patrones y el porcentaje de error de medida por espectrofluorimetría.

4.2.3. Biomarcadores moleculares

Todos los análisis de biomarcadores moleculares expuestos en esta tesis fueron realizados en el laboratorio del Grupo de Biología y Toxicología Ambiental de la UNED.

4.2.3.1. Actividad de la Glutación–S–Transferasa

Para la cuantificación de la actividad de la Glutación S-Transferasa (GST) se realizó una extracción de proteínas tal y como se describe en el epígrafe correspondiente y se valoró espectrofotométricamente empleando el kit comercial “Glutathione S-Transferase (GST) Assay Kit”, que permite la detección de un amplio rango de diferentes isoformas de la enzima GST mediante la utilización de 1-cloro-2,4- dinitrobenzenu (CDNB).

El incremento de la conjugación del grupo tiol del glutatión al sustrato CDNB produce un aumento en la absorbancia a 340 nm. Los valores de actividad enzimática de las muestras se calcularon mediante la interpolación de los datos de absorbancia con los de las disoluciones patrón.

4.2.3.2. Transcripción inversa

En este trabajo se emplearon los valores de expresión de los genes que codifican el EcR, el CYP450, la HSP70 y la HSC 70 como biomarcadores. Para cuantificar dichas expresiones génicas se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR y PCR en tiempo real). A partir de RNA mensajero (RNAm) contenido en los extractos ya purificados de RNA (ver epígrafes anteriores) y a través de las técnicas de RT-PCR y PCR en tiempo real, se obtuvieron los fragmentos correspondientes de DNA complementario (DNAc), que a su vez sirvieron como molde para su amplificación por PCR. La transcripción inversa, o retrotranscripción, del RNA de las muestras se llevó a cabo utilizando el kit comercial M-MLV Reverse Transcriptase.

A 500 ng de cada muestra de RNA se le añadieron 0.5 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de Oligo(dT) 12-18, 1 μl de mezcla dNTP 10 mM y agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 12 μl . Se incubó esta mezcla durante 5 minutos a 65 °C y posteriormente se mantuvo en hielo durante 10 minutos. Se añadieron a continuación 4 μl de 5x First-Strand Buffer, 2 μl de DTT 0.1 M y 1 μl de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 unidades μl^{-1}) y se incubó la mezcla durante 2 minutos a 37 °C; se añadió 1 μl de M-MLV RT y se mantuvo a 37 °C durante 50 minutos. Finalmente, se inactivó la reacción calentando 15 minutos a 70 °C. Las muestras de DNAc se conservaron a -20 °C hasta su uso.

4.2.3.3. Análisis mediante PCR

Las amplificaciones por PCR semicuantitativa de los fragmentos de DNAc correspondientes a las proteínas estudiadas en este trabajo se llevaron a cabo utilizando la enzima Taq Polimerasa, siguiendo las especificaciones de la casa comercial y en un termociclador C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad). Para asegurar la mayor homogeneidad de los componentes de la PCR y minimizar los errores finales derivados del pipeteo, se estableció un protocolo de preparación de las muestras a amplificar.

Asimismo, para permitir la normalización de los resultados de expresión génica con respecto al gen de referencia seleccionado, la amplificación de los fragmentos de estudio se llevó a cabo en paralelo y de forma simultánea mediante dos programas distintos del termociclador, atendiendo a los ciclos en los que cada gen se amplifica correctamente y evitando la saturación de los genes de referencia.

Para la separación de los productos de PCR se emplearon geles de poliacrilamida al 9% en TGE (Tris-HCl 50 mM pH 8.5, glicina 380 mM, EDTA 2 mM) con 30% acrilamida/bisacrilamida 29:1, persulfato amónico al 10% p/v y TEMED al 100% v/v. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente y voltaje constante de 60 mV, en un equipo MiniProtein (BioRad). Las muestras se disolvieron en tampón de carga

(glicerol al 50% v/v, Tris-HCl 10 mM pH 7, azul de bromofenol al 0.1% p/v). Una vez terminada la electroforesis, se fotografió el gel con la ayuda de un equipo Chemigenius 3 (Syngene, Inglaterra), mediante el programa Gene Snap 6.05, y se almacenó la imagen para su posterior procesamiento y cuantificación. La cuantificación de las bandas obtenidas en los geles de poliacrilamida se llevó a cabo con el programa Image J 1.47q (NIH, EE.UU.). Ésta se basó en la selección de las distintas bandas del gel manteniendo constante el ancho a cuantificar, de manera que variaciones en el valor final se correspondieran con diferencias en la intensidad de la banda y no con el área que ocupó la misma.

4.2.3.4. Extracción del DNA del gel de agarosa

Los diferentes fragmentos de los genes de estudio, amplificados mediante PCR, fueron extraídos del gel de agarosa según el procedimiento descrito por BOYLE & LEW (1995). Para ello, las bandas correspondientes a los tamaños de fragmentos esperados fueron cortadas del gel e introducidas en tubos Eppendorf. En cada caso, una vez calculado el peso de cada banda se añadió al tubo correspondiente el doble de volumen (μl) de NaI 6 M (Fluka) que de peso de la banda en agarosa (mg). Todos los tubos se mantuvieron 5 minutos en un baño a 55 °C hasta conseguir la fusión total de la agarosa. Posteriormente, en cada tubo se añadieron 10 μl de sílica (Sigma) y se mezclaron bien los componentes. Tras 10 minutos en hielo, se centrifugó y se retiró el sobrenadante, quedando el DNA unido a la sílica en el fondo de los tubos. A continuación se realizaron dos series compuestas por:

- Lavado con la misma cantidad de solución de lavado (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 2.5 mM, etanol 50% v/v) que la utilizada de NaI 6 M al inicio del proceso, mezclando bien el contenido de los tubos con el vórtex para homogeneizar correctamente la solución de lavado y el complejo DNA-sílica.
- Posterior centrifugado de los tubos y retirada del sobrenadante.

Finalmente, el DNA de los tubos se resuspendió en 12 μ l de agua destilada.

4.2.3.5. Análisis mediante PCR en tiempo real (Real Time PCR)

En primer lugar fue necesario conocer la eficiencia de la PCR, dado que este valor se utiliza como factor de corrección en el cálculo de los niveles de expresión génica para cada gen. En su cálculo, para cada pareja de oligonucleótidos (cebadores) se preparan diluciones seriadas (1/1 - 1/16) de una muestra de DNAC procedente de la mezcla de distintos tratamientos experimentales, lo que proporciona una curva estándar del cambio de los valores de Ct (*cycle threshold*), que es el número de ciclos de PCR necesario para que la señal fluorescente cruce el valor umbral (por ejemplo, la fluorescencia de fondo). Para determinar la eficiencia de amplificación se emplea la pendiente de la regresión lineal obtenida con las diluciones. Las eficiencias obtenidas para los distintos genes estudiados fueron las siguientes:

Partiendo del DNAC obtenido en el proceso de retrotranscripción se llevó a cabo la PCR en tiempo real, empleando para ello la mezcla comercial SsoFast™ EvaGreen® Supermix. Para obtener un volumen final de reacción de 20 μ l se añadieron: 10 μ l Sso-Fast™ EvaGreen® Supermix, 0.6 μ l cebador directo (10 μ M), 0.6 μ l cebador inverso (10 μ M), 7.8 μ l agua bidestilada y 1 μ l muestra DNAC (500 ng μ l⁻¹). La PCR cuantitativa se llevó a cabo con el termociclador CFX96 (Bio-Rad), mediante un programa que incluía una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95 °C y 35 ciclos con una desnaturalización de 5 segundos a 95 °C, anillamiento durante 15 segundos a 58 °C y elongación durante 10 segundos a 65 °C. Al término de cada programa se realizó una curva de desnaturalización para verificar la eficacia de cada amplicón. Para la cuantificación de los niveles de expresión de los genes estudiados se emplearon los valores umbral del ciclo, correspondientes a la fluorescencia detectada en la fase exponencial

de la reacción, donde hay una correlación entre la intensidad de la señal fluorescente y la cantidad inicial de DNAc. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa informático CFX-Manager Software 2.1 (Bio-Rad). Este software se empleó en el cálculo de los niveles de cada RNAm con respecto a los de tres genes de referencia endógenos. Se prepararon las muestras por duplicado en las placas correspondientes y se analizaron tres réplicas de cada uno de los experimentos.

Con objeto de comprobar si los fragmentos amplificados correspondían realmente a los genes objeto de nuestro estudio, así como con la finalidad de utilizar algunos fragmentos como sonda para hibridación in situ, se llevó a cabo la clonación y secuenciación de los mismos.

4.2.4. Análisis de anomalías morfológicas

La metodología de análisis empleada para el estudio de la anatomía de los individuos varía según el grupo del que se trate. Para el estudio de la morfología de los macroinvertebrados resulta imprescindible la observación de los individuos bajo la lupa binocular y, con frecuencia, es necesario realizar preparaciones microscópicas de diversas estructuras. Toda la metodología descrita a continuación está basada en la descrita por SERVIA (2001)

4.2.4.1. Preparaciones microscópicas

- Una vez separadas del cuerpo con la ayuda de un bisturí y unas pinzas, las cápsulas cefálicas se introdujeron en una disolución de KOH al 10% a 50 °C durante unas 2 horas.
- Posteriormente fueron limpiadas con etanol. La digestión con KOH eliminó el contenido de las cápsulas y clarificó y ablandó la cutícula, facilitando así su montaje y observación.

- Durante todo el proceso de aclarado del material se puso especial cuidado en que la temperatura de la disolución de KOH no fuese excesiva, con el fin de evitar las frecuentes distorsiones que se producen en el material entomológico manipulado incorrectamente.
- Con el material una vez aclarado se realizaron las preparaciones microscópicas, utilizando como medio de montaje semipermanente gel de glicerina con la siguiente composición: 10 g de gelatina, 50 ml de glicerina, 60 ml de agua destilada y 0.5 g de fenol cristalizado. Este medio presenta la ventaja de que puede ser licuado al aumentar la temperatura, lo cual facilita muchas de las operaciones que con él se realizan.

En cada portaobjetos fueron colocadas seis cápsulas cefálicas aisladas, dispuestas de forma que pudiera observarse su cara ventral y colocando un cubreobjetos sobre ellas, ejerciendo después una ligera presión sobre él para facilitar la apertura de las mandíbulas y evitar así la superposición con el mentum. Se procuró eliminar las burbujas de aire que pudiesen interferir al observar las cápsulas al microscopio.

4.2.4.2. Observación y recuento

Cada una de las cápsulas cefálicas montadas fue observada en el microscopio con un aumento de 500x. Tras el análisis detallado de la morfología de cada individuo, se anotaron todos aquellos casos en los que se observaron deformidades en el mentum. En el presente trabajo no se incluyen bajo el término de deformidades los casos de fractura o desgaste por abrasión de las piezas.

Los primeros hallazgos de individuos deformes, así como muchos trabajos posteriores, ofrecen únicamente la frecuencia de individuos deformes observados en un determinado lugar (HAMILTON & SAETHER, 1971; HARE & CARTER, 1976; WIEDERHOLM, 1984; CANFIELD *ET AL.*, 1994; 1996; 1998). Otros trabajos se centraron en el análisis de la incidencia de deformidades de forma separada para cada estructura de la cápsula cefálica (WARWICK

1988, WARWICK, 1989, 1991; BIRD *ET AL.*, 1995; JANSSENS DE BISTHOVEN *ET AL.*, 1995; PETTIGROVE *ET AL.*, 1995; VERMEULEN *ET AL.*, 1998; MEREGALLI *ET AL.*, 2001). Debido a la mayor tendencia del mentum a presentar deformidades y a la sencillez de su análisis, muchos autores incluyen en sus trabajos únicamente deformidades presentes en esta estructura (DICKMAN *ET AL.*, 1992; URK *ET AL.*, 1992; DIGGINS & STEWART, 1993; HUDSON & CIBOROWSKI, 1996 A, B).

WARWICK (1985) fue el primer autor que propuso analizar, no solo la incidencia de las deformidades, sino también la gravedad de las mismas, estableciendo el grado de severidad de éstas. Posteriormente varios autores desarrollaron índices atendiendo al grado de severidad de las deformidades de distintas estructuras (KLINK 1984; WARWICK & TISDALE 1988; DERMOTT, 1991; WARWICK, 1991; 1992). Es resaltable el trabajo de LENAT (1993), en el que desarrolló un índice denominado *Toxic Score* que empleaba exclusivamente del mentum de *Chironomus*, era pues, de aplicación mucho más sencilla que los anteriores.

VERMEULEN *ET AL.* (1998) diseñaron un nuevo método de asignación del grado de severidad para deformidades del mentum, mandíbulas y peine epifaríngeo, y en el que tratan de valorar el área aproximada que se ve afectada por la deformidad. De este modo tratan de estandarizar y reducir la subjetividad del análisis, además de simplificar el tedioso examen de todos los dientes de cada una de las piezas.

Todos estos índices de severidad representaron un avance en el uso de las deformidades, ya que su finalidad era utilizar su valor como indicador de un cierto grado de contaminación, establecido en función de datos fisicoquímicos de agua o sedimento y de datos de las comunidades residentes en ese mismo lugar. Por ello, diversos autores han recurrido a estos índices para contrastar la información obtenida por ellos y, sin necesidad de realizar costosos análisis químicos, ofrecer un valor indicativo del grado de estrés al que estaban sometidos sus puntos de muestreo (ASTON, 1998; SERVIA *ET AL.*, 1998 B; REYNOLDS & FERRINGTON, 2001).

URK *ET AL.* (1992) observaron tras su estudio que los tipos más severos

de deformidades aparecen con frecuencia en los lugares en los que las larvas presentan mayores frecuencias de deformidades. Posteriormente HÄMÄLÄINEN (1999) confirmó que a medida que aumenta la frecuencia de deformidades, también aumenta la severidad.

Finalmente, tanto JANSSENS DE BISTHOVEN *ET AL.* (1995) como VERMEULEN *ET AL.* (1998) concluyen, tras la elaboración de estudios independientes con *Chironomus*, que el uso de datos de severidad y frecuencia es redundante, y que los valores de frecuencia aislados pueden ofrecer información suficiente. Así, VERMEULEN *ET AL.* (1998) ofrecen valores de frecuencia de deformidades presentes en el mentum que podrían ser asociados a distintos grados de contaminación y JANSSENS DE BISTHOVEN (2000) ofrece un sistema de evaluación similar, aunque teniendo en cuenta las deformidades observadas también en mandíbulas y antenas.

Los resultados obtenidos durante este estudio han sido expresados como porcentajes de individuos con deformidades en el mentum, sin atender a su severidad y obviando la fractura del diente central del mentum, debido a la controversia entre varios investigadores sobre su origen, que podría no estar relacionado con la contaminación (SERVIA *ET AL.*, 2002).

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el tratamiento de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, versión 10.0), ya que presenta una amplia gama de test que facilitan el desarrollo de los análisis. Debido al tipo de datos obtenidos durante este estudio, los métodos utilizados son principalmente contrastes de hipótesis, la aplicación de diferentes pruebas para variables de tipo continuo y algunos análisis de tipo multivariante. En todo el proceso de análisis estadístico de los datos se determinó, como estadísticamente significativa toda aquella probabilidad asociada (α) menor o igual que 0.05.

4.3.1. Pruebas estadísticas de normalidad y homocedasticidad.

Para el análisis de la normalidad y homocedasticidad se empleó el paquete estadístico “SPSS 19.0” para “Windows”. Para comprobar si la distribución de nuestros datos se ajustaba a una distribución normal se emplearon tanto métodos gráficos (histogramas y curvas de normalidad) como estadísticos (Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk). Para el análisis de homogeneidad de las varianzas u homocedasticidad se empleó el estadístico de Levene.

4.3.2. Análisis de diferencias entre submuestras

Para la comparación de los parámetros analizados entre estaciones se utilizó estadística paramétrica, mediante el uso de ANOVA de un factor; en los casos en los que los datos se ajustaban a una distribución normal y sus varianzas eran homogéneas; y el test de Kruskal-Wallis para los casos en los que la falta de normalidad u homocedasticidad requirieron el uso de estadística no paramétrica.





CAPÍTULO 5. RESULTADOS



En este capítulo se muestran todos los resultados obtenidos, salvo los correspondientes al estudio metodológico relativo a la extracción y cuantificación de RNA, que ya han sido expuestos y discutidos en el capítulo anterior.

5.1. ESTUDIO INTERPOBLACIONAL

5.1.1. Análisis químico

5.1.1.1. Análisis cuantitativo de agua

En la tabla 7 se muestran los resultados de los análisis cuantitativos de agua y en la gráfica de la figura 18 los índices de contaminación relativa (ICR) del agua según las familias de contaminantes analizados cuantitativamente.

Tabla 7. Concentraciones de las sustancias analizadas en el agua de las tres estaciones de muestreo. Los valores máximos de cada compuesto aparecen sombreados.

	SAR	LOURO	CON
Alquilfenoles		ng/L	
Bisfenol A (BPA)	82.28	24.52	52.29
Nonilfenol (NP)	53.67	37.67	16.05
Productos farmacéuticos		ng/L	
Ibuprofeno	2025.18	1484.18	122.54
Diclofenaco	22.80	18.96	< 5.00
Carbamazepina	7.45	11.18	8.06
Atenolol	196.70	187.07	77.33
Cafeína	14364.77	10124.85	8448.35
Flumequina	5.20	< 5.00	< 5.00
Amoxiciclina	5.64	< 5.00	< 5.00
Enrofloxacina	< 5.00	< 5.00	< 5.00
Fragancias		ng/L	
Galaxolida	3074.03	3026.50	1447.42
Tonalida	80.09	616.50	186.04

Tabla 7. Continuación

	SAR	LOURO	CON
Pesticidas organoclorados		ng/L	
a-HCH	9.68	6.56	8.52
b-HCH	16.17	13.12	16.07
g-HCH	19.79	11.27	19.66
d-HCH	18.17	9.57	19.41
Heptacloro	< 3.00	< 3.00	< 3.00
Aldrín	< 3.00	< 3.00	< 3.00
Heptacloro epoxido	< 3.00	< 3.00	< 3.00
g-Clordano	< 3.00	< 3.00	< 3.00
a-Chlordano	< 3.00	< 3.00	< 3.00
a-Endosulfano	5.01	< 3.00	9.32
p,p'-DDE	11.12	3.51	12.82
Dieldrín	9.81	< 3.00	10.93
Endrín	< 3.00	< 3.00	< 3.00
Pesticidas organoclorados		ng/L	
b-Endosulfano	14.96	6.82	16.63
p,p'-DDD	9.06	3.01	14.29
Endrín aldehído	3.31	3.31	6.35
Endosulfano sulfato	< 3.00	< 3.00	< 3.00
p,p'-DDT	14.8	7.37	18.63
Endrín cetona	22.04	< 3.00	14.4
Methoxicloro	< 3.00	< 3.00	< 3.00
Metales pesados		µg/L	
Cd	<0.01	<0.01	<0.01
Pb	<0.5	<0.5	<0.5
Cr	1.67	0.7	<0.3
Ni	2.82	1.34	<0.4
Cu	2.1	0.44	0.44
As	1.97	4.19	0.30
Hg	<0.05	<0.05	<0.05
Mn	60.29	118.19	6.05
Zn	14.47	10.51	2.61
Al	17.51	1.63	3.29

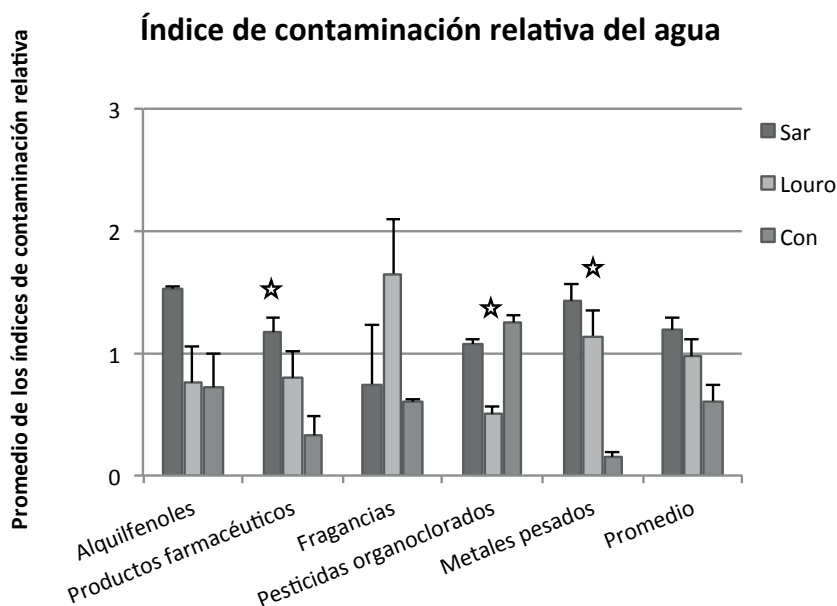


Figura 18. Valores promedio por familia de contaminantes, del índice de contaminación relativa del agua. Las estrellas indican diferencias significativas entre estaciones según el test de Kruskal-Wallis (p -valor <0.05).

Según el test de Kruskal-Wallis existen diferencias significativas entre estaciones en las concentraciones de productos farmacéuticos, pesticidas organoclorados y metales pesados. Las muestras del río Sar son las que mayor grado de contaminación muestran para alquilfenoles, productos farmacéuticos y metales pesados. La estación “Louro” es en la que se detectó una mayor concentración de fragancias. La estación del río Con muestra los valores mínimos del ICR promedio, así como de concentración en todas las familias de contaminantes, excepto la de los pesticidas organoclorados.

5.1.1.3. Análisis cuantitativo de sedimentos

En la tabla 8 se muestran los resultados del análisis cuantitativo de contaminantes en el sedimento por estaciones.

Tabla 8. Concentraciones de las sustancias analizadas en el agua de las tres estaciones de muestreo. Los valores máximos de cada compuesto aparecen sombreados.

	SAR	LOURO	CON
Alquilfenoles			
	ng/L		
Bisfenol A (BPA)	18.84	7.44	0.77
Nonilfenol (NP)	0.77	0.31	0.58
Productos farmacéuticos			
	ng/L		
Ibuprofeno	25.62	14.41	3.73
Diclofenaco	0.85	0.86	1.06
Carbamazepina	< 0.10	0.23	< 0.10
Atenolol	18.07	8.36	9.84
Cafeína	0.94	0.65	0.62
Flumequina	< 0.10	< 0.10	< 0.10
Amoxiciclina	< 0.10	< 0.10	< 0.10
Enrofloxacina	< 0.10	< 0.10	0.17
Fragancias			
Galaxolida	8	3	6
Tonalida	7.6	6	6
Pesticidas organoclorados			
	ng/L		
a-HCH	0.13	1.26	< 0.10
b-HCH	< 0.10	0.32	< 0.10
g-HCH	0.12	< 0.10	< 0.10
d-HCH	< 0.10	1.85	0.36
Heptacloro	0.26	0.11	0.1
Aldrín	0.2	< 0.10	0.16
Heptacloro epoxido	< 0.10	< 0.10	< 0.10
g-Clordano	0.1	0.37	0.17
a-Chlordano	< 0.10	0.37	0.12

Tabla 8. Continuación

	SAR	LOURO	CON
Pesticidas organoclorados			
		ng/L	
a-Endosulfano	0.72	< 0.10	0.83
p,p'-DDE	0.3	0.76	0.2
Dieldrín	< 0.10	< 0.10	< 0.10
Eldrin	0.64	1.18	< 0.10
b-Endosulfano	19.28	18.25	6.27
p,p'-DDD	0.27	1.7	1.1
Endrín aldehído	3.29	< 0.10	2.28
Endosulfano sulfato	0.62	4.13	4.28
p,p'-DDT	1.93	3.21	4.01
Endrín cetona	0.92	6.41	4.19
Methoxicloro	1.99	1.16	2.21
Metales pesados			
		ug/g	
Cd	< 0.10	< 0.10	< 0.10
Pb	11.52	5.96	8.28
Cr	19.83	5.02	4.15
Ni	10.50	2.99	3.62
Cu	20.37	3.13	5.81
As	2.35	3.01	4.24
Hg	0.05	<0.05	<0.05
Mn	96.31	128.46	210.00
Zn	84.86	31.47	56.14
Al	8340.86	6470.02	9900.00
Fe	9185.77	8034.51	17141.89

La gráfica de la figura 19 muestra los distintos grados de contaminación de los sedimentos en las tres estaciones de muestreo, según el análisis cuantitativo por familias de contaminantes. Sólo se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre estaciones en las concentraciones de metales pesados. La estación “Sar” es la que mayor grado de contaminación

de los sedimentos muestra para metales pesados y también para todas las demás familias de contaminantes salvo para la de los pesticidas organoclorados en la que la estación “Louro” la supera. Coherentemente la estación Sar es la que mayor ICR promedio obtiene. Son subrayables los incrementos del ICR de los metales pesados y productos farmacéuticos con respecto a los obtenidos en los análisis de agua en la estación “Con”.

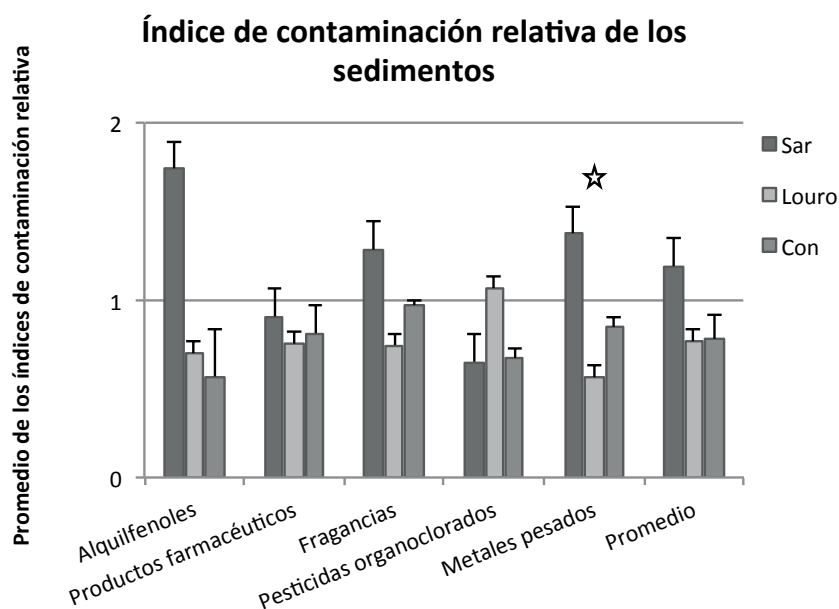


Figura 19. Valores promedio por familia de contaminantes, del índice de contaminación relativa de los sedimentos. La estrella indica diferencias significativas entre estaciones según el test de Kruskal-Wallis (p -valor <0.05).

5.1.1.4. Análisis cualitativo de agua

En la tabla 9 y en la gráfica de la figura 20 se muestra el número de compuestos xenobióticos detectados en el agua mediante análisis no cuantitativos por estación y por grupo de contaminantes.

En la estación “Sar” se detectó la presencia de 30 de los 79 compuestos, un 38%, con representación en todas las familias de contaminantes. En la estación “Louro” se hallaron 25 de los 79 compuestos (32%) pertenecientes a todas las familias excepto a la de los estrógenos. En la estación “Con” se detectaron 12 contaminantes (15%) de tipo farmacéutico, plaguicida o pesticida.

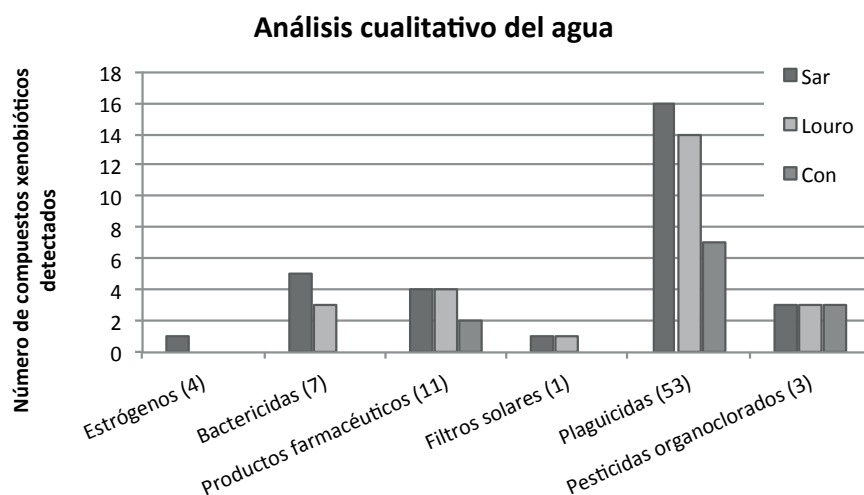


Figura 20. Histograma de frecuencias de compuestos xenobióticos detectados en el agua por familias y por estaciones, entre paréntesis el número de compuestos analizados.

Tabla 9. Presencia de sustancias analizadas en el agua de las tres estaciones de muestreo estudiadas.

	SAR	LOURO	CON
Estrógenos			
17- α - Ethynylestradiol (EE2)	•		
Bactericidas			
Metil parabeno	•	•	
Ethyl parabeno	•	•	
n-propilparabeno	•		
n-butilparabeno	•		
bencilparabeno	•	•	
Productos farmacéuticos			
Ketoprofeno	•	•	•
Ácido salicílico	•	•	•
Fenoprofeno	•	•	
Indometacina			
Salbutamol	•	•	
Filtros solares			
4-metilbencilideno camfor	•	•	
Plaguicidas			
Acefato	•	•	
Acetamiprid	•		
Benomil	•	•	
Carbendazim	•	•	
Clorotolurón	•	•	
Clorpirifós	•	•	•
Fenamifos	•	•	
Fipronil			•
Fipronil-sulfona			•
Fluroxipir	•		
Imazalil	•	•	
Isoproturón	•	•	•
Linurón	•	•	•
Metamidofos			
Metiocarb	•	•	•
Pirimicarb	•	•	•
Pirimifós-etil	•	•	
Pirimifós-metil	•	•	
Thiacloprid	•	•	
Pesticidas organoclorados			
Clorpirimifós-metil	•	•	•
Dicofol	•	•	•
Hexaclorobenceno	•	•	•

5.1.1.5. Análisis cualitativo de los sedimentos

En la tabla 10 y en la gráfica de la figura 21 se muestra el número de compuestos xenobióticos detectados en los sedimentos por estación y por grupo de contaminantes.

En la estación Sar se detectó la presencia cualitativa de 24 de los 79 (30%) compuestos, con representación en todas las familias de contaminantes, excepto estrógenos, igual que en la estación Louro, en la que se hallaron 17 de los 79 compuestos (22%). En los sedimentos de la estación Con se detectaron 7 contaminantes (9%) de tipo farmacéutico, plaguicida o pesticida.

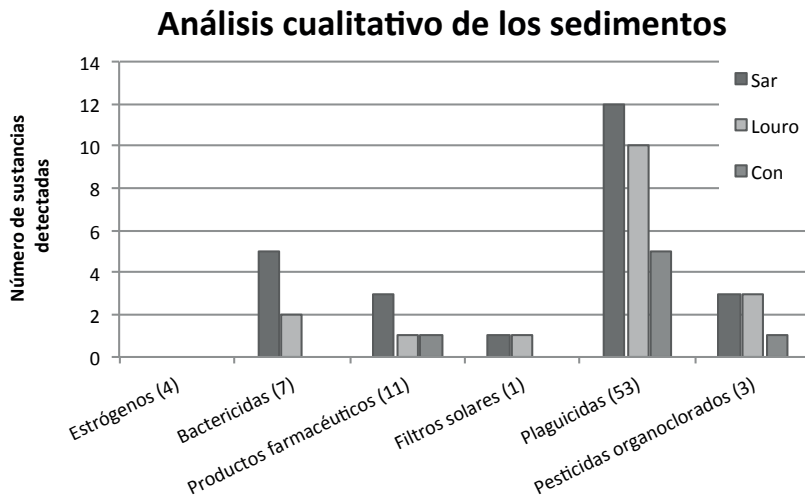


Figura 21. Histograma de frecuencias de compuestos xenobióticos detectados en los sedimentos por familias y por estaciones, entre paréntesis el número de compuestos analizados.

Tabla 10. Presencia de las sustancias analizadas en los sedimentos de las tres estaciones de muestreo estudiadas..

	SAR	LOURO	CON
Bactericidas			
Metil parabeno	•	•	
Etil paraben	•		
n-propilparabeno	•		
n-butilparabeno	•		
Benzilparabeno	•	•	
Productos farmacéuticos			
Ketoprofeno	•		
Ácido salicílico	•	•	•
Fenoprofeno	•		
Pesticidas organoclorados			
Metil Clorpirifós	•	•	
Dicofol	•	•	
Hexaclorobenzeno	•	•	•
Clorpirifós	•	•	•
Fenamifós	•	•	
Fipronil			•
Fipronil-sulfona			•
Fluroxipir	•		
Imazalil	•	•	
Isoproturón	•	•	•
Metiocarb	•	•	•
Pirimicarb	•	•	
Pirimifós-etil	•	•	
Pirimifós-metil	•	•	

5.1.1.6. Cálculo del contenido en materia orgánica de los sedimentos

El cálculo de la cantidad de materia orgánica en el sedimento resultó ser significativamente diferente en las tres estaciones muestreadas ($F=41,38064823$ p-valor <0.001). Como se aprecia en la figura 22, la estación “Sar” fue en la que mayor cantidad de materia orgánica se midió y en la estación “Con” en la que menos

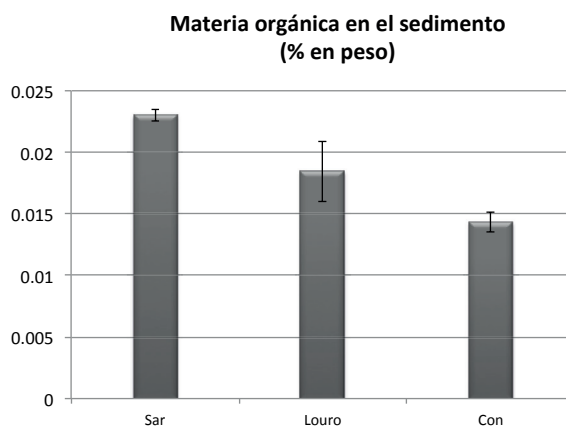


Figura 22. Cantidad de materia orgánica contenida en el sedimento expresada en porcentaje de peso seco.



5.1.2. Biomarcadores moleculares

En la tabla 11 se muestran los resultados de los biomarcadores moleculares estudiados: niveles de expresión de RNAm de HSP70, HSC70, EcR y CYP4G y actividad enzimática de GST.

Tabla 11. Valores de expresión génica de la HSP70, HSC70 EcR y CYP4G de actividad enzimática de la GST de las cuatro poblaciones estudiadas. Los valores densitométricos de mRNA se calcularon empleando el GAPDH y 26s como genes de referencia.

	HSP70	HSC70	ECR	CYP450	GST
Laboratorio	0.136	1.554	0.319	1.334	0.20
	0.082	1.682	0.388	1.619	0.16
	0.169	1.515	0.700	1.214	0.15
	0.029	1.890	0.374	1.039	0.17
Con	0.666	1.313	0.608	1.124	0.16
	0.816	1.510	0.629	1.151	0.17
	0.523	1.202	0.441	1.132	0.20
	0.918	2.002	1.317	1.582	0.16
	-	-	-	-	0.21
	-	-	-	-	0.17
Sar	0.403	1.393	0.599	1.409	0.30
	0.223	1.557	0.567	1.437	0.23
	0.397	1.117	0.649	0.858	0.30
	0.085	1.693	0.750	1.361	0.21
	-	-	-	-	0.23
Louro	0.460	1.240	0.758	1.331	0.21
	0.300	1.349	0.567	1.118	0.21
	0.415	1.154	0.634	1.077	0.28
	0.058	1.602	0.711	1.184	0.22
	-	-	-	-	0.32

En la figura 23 se observan los niveles de expresión de la HSC70 y la HSP70 por poblaciones y estandarizados con los valores de los genes GAPDH y 26s.

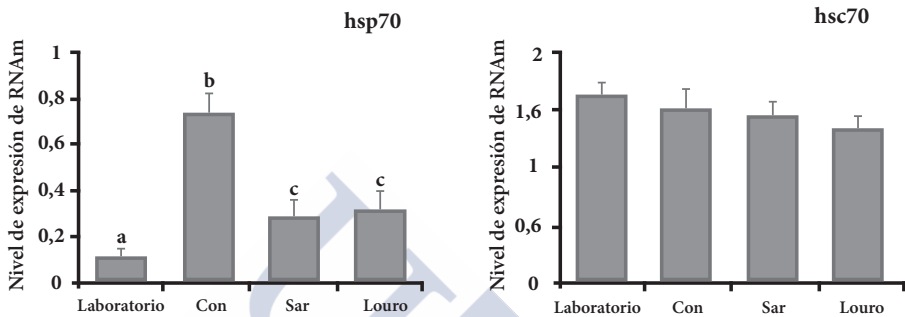


Figura 23. Niveles de expresión del gen hsp70 (izquierda), gen hsc70 (derecha) en larvas de *C. riparius* de cultivos de laboratorio y poblaciones silvestres muestreadas en los ríos Con, Sar y Louro. Los valores densitométricos de mRNA se calcularon empleando el GAPDH y 26s como genes de referencia. Cada barra representa la media y la barra de error el error típico. Por cada población se utilizaron 20 larvas, se separaron en grupos de cinco y se realizaron cuatro repeticiones experimentales. Diferentes letras indican diferencias entre grupos (p -valor < 0.05)

En los niveles de expresión de la HSC70 no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre poblaciones. En los niveles de expresión de RNAm de la HSP70 sí se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas: las larvas del río Con mostraron los niveles más altos, las larvas procedentes de laboratorio los más bajos y las de los ríos Sar y Louro niveles intermedios y sin diferencias entre sí.

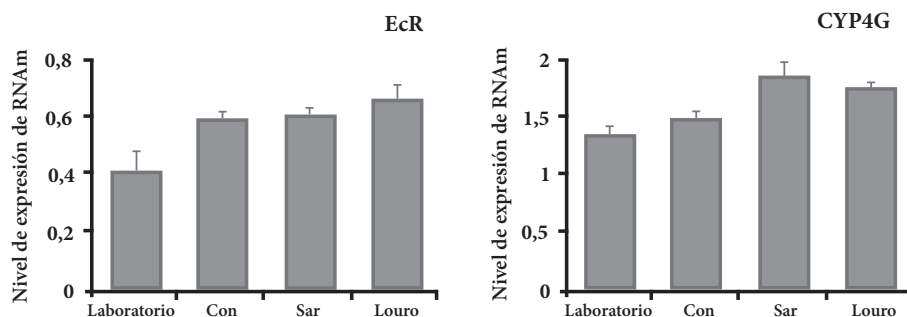


Figura 24. Niveles de expresión del gen EcR en larvas de *C. riparius* de cultivos de laboratorio y poblaciones silvestres muestreadas en los ríos Con, Sar y Louro. Los valores densitométricos de mRNA se calcularon empleando el GAPDH y 26s como genes de referencia. Cada barra representa la media y la barra de error el error típico. Por cada población se utilizaron 20 larvas, se separaron en grupos de cinco y se realizaron cuatro repeticiones experimentales. Diferentes letras indican diferencias entre grupos (p -valor < 0.05)

Los niveles de expresión del gen del receptor de la ecdisona (EcR) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre poblaciones (figura 24, izquierda). Del mismo modo los niveles de expresión del gen del citocromo (CYP4G) tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas entre poblaciones (figura 24, derecha)

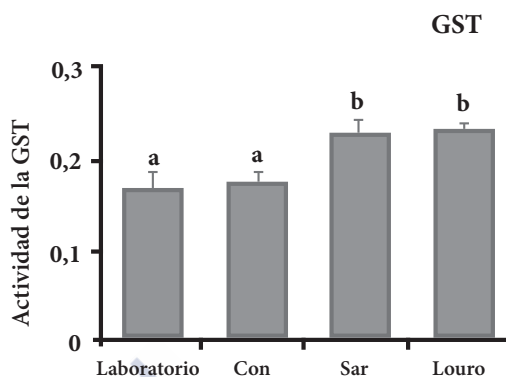


Figura 25. Análisis de la actividad enzimática de la glutatión S-transferasa en larvas de *C. riparius* de cultivos de laboratorio y poblaciones silvestres muestreadas en los ríos Con, Sar y Louro. Cada barra representa la media y la barra de error el error típico. Por cada población se utilizaron al menos 20 larvas, se separaron en grupos de cinco y se realizaron entre cuatro y seis repeticiones experimentales. Diferentes letras indican diferencias entre grupos (p -valor < 0.05)

Los resultados de los experimentos realizados para evaluar la actividad enzimática de la glutatión S-transferasa (GST) mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las cuatro poblaciones se diferenciaron en dos grupos: por un lado la población de laboratorio y del río Con y por otro las poblaciones del Sar y del Louro, estas últimas con mayor actividad enzimática (figura 25).

5.1.3. Indicadores metabólicos

En la tabla 12 y en la figura 26 se muestran los resultados de las cuantificaciones de glucógeno y proteínas totales el mg por g de peso fresco

Tabla 12. Valores de concentración de glucógeno y proteínas totales expresados en miligramos por gramo de peso fresco para las cuatro poblaciones de *C. riparius* estudiadas. En cada réplica se incluyeron cuatro larvas.

	Glucógeno (mg/g)	Proteínas (mg/g)
Laboratorio	11.95	35.18
	12.76	37.03
	9.29	36.21
	11.34	36.14
Con	3.86	46.81
	4.78	44.02
	2.42	43.99
	3.69	44.94
Sar	14.03	53.56
	10.44	37.80
	13.27	50.54
	12.58	47.30
Louro	11.98	42.31
	5.98	32.22
	10.61	42.60
	9.52	39.04

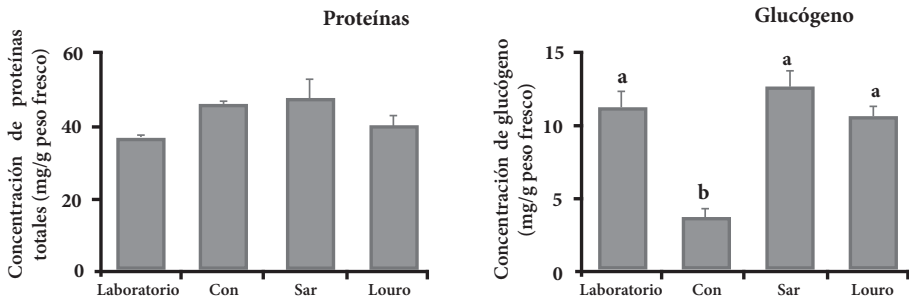


Figura 26. Concentración de proteínas (izquierda) y glucógeno (derecha), expresada en mg por g de peso fresco de larvas de *C. riparius* de cultivos de laboratorio y poblaciones silvestres muestreadas en los ríos Con, Sar y Louro. Cada barra representa la media y la barra de error el error típico. Diferentes letras indican diferencias entre grupos (p -valor < 0.05).

El análisis estadístico de los datos de cuantificación de proteínas totales no mostró diferencias significativas entre las cuatro poblaciones (figura 26 izquierda); por el contrario si se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de glucógeno: las muestras de la población del río Con contienen menos glucógeno que todas las demás, entre las cuales no se hallaron diferencias (figura 26 derecha).

Se realizó un análisis de correlación canónica (CCA) (figura 27), empleando todos los indicadores y variables abióticas que presentaron diferencias estadísticamente significativas. Este análisis discrimina los datos integrados de las variables bióticas, representados mediante números, en función de las abióticas, representadas con flechas que actúan como ejes proporcionales –a mayor longitud, mayor relevancia– en la distribución espacial de los datos. En este el resultado fue estadísticamente significativo (p -valor=0.003) y la variable más relevante fue la concentración de materia orgánica en el sedimento.

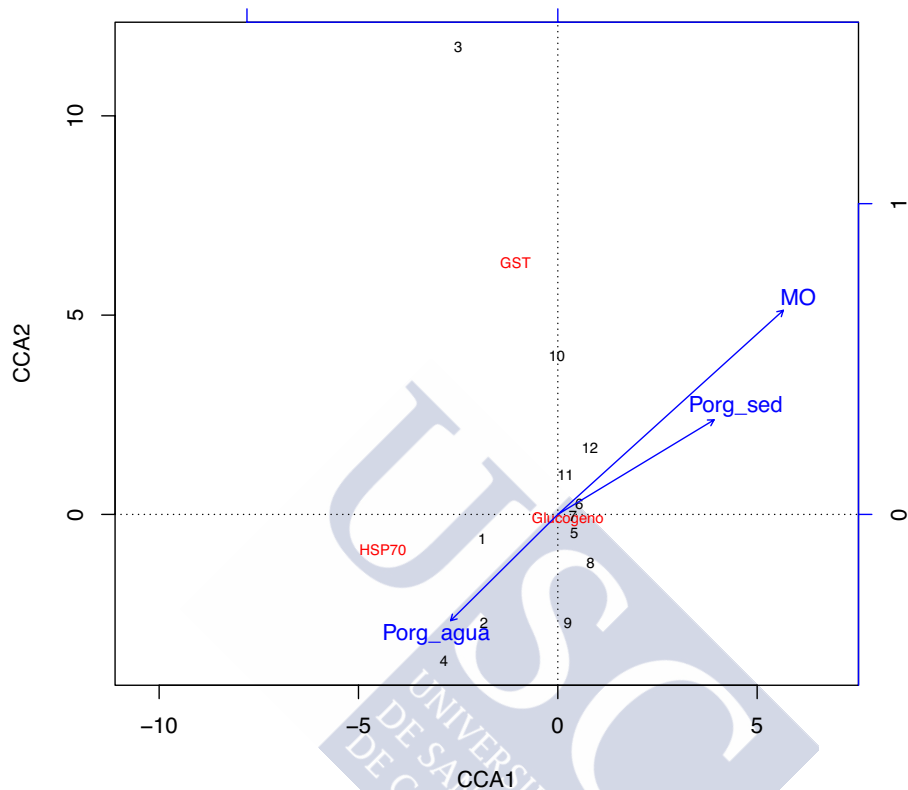


Figura 27. CCA realizada con los indicadores metabólicos, marcadores moleculares y variables abióticas que se mostraron estadísticamente significativas entre poblaciones.

5.1.4. Marcadores morfológicos

En la figura 28 se muestran cuatro cápsulas cefálicas de larvas de cuarto estadio de *C. riparius* empleadas para el estudio de deformidades; una con el mentum sin deformidades y otros tres *menta* con algún tipo de deformidad.

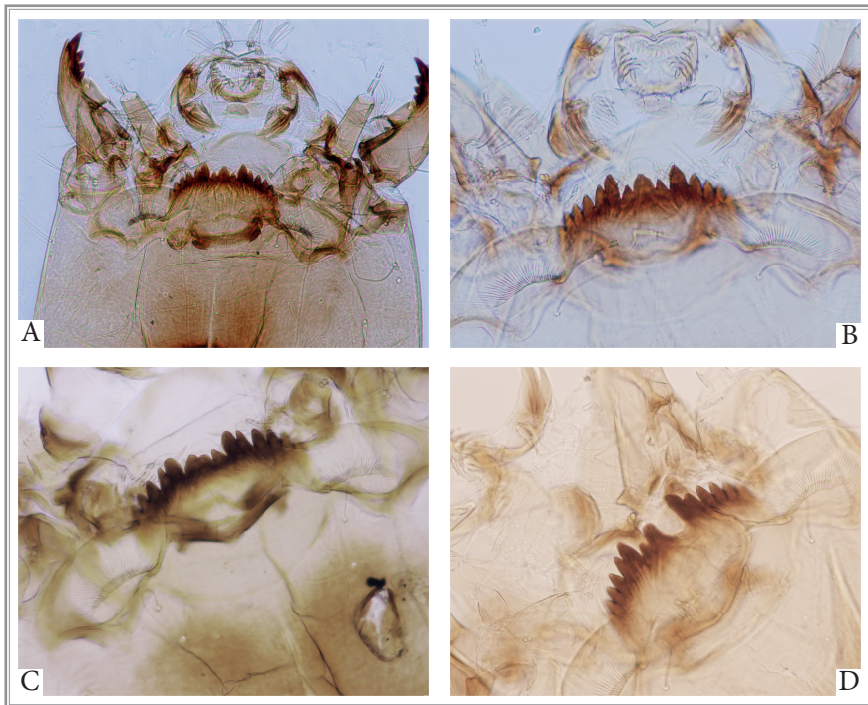


Figura 28. Fotografías de cápsulas cefálicas de larvas de cuarto estadio de *C. riparius* en posición ventral mostrando el mentum (500x). A: sin deformidades, B: diente perdido, C: fusión de dientes, D: hueco.

El estudio de frecuencia de deformidades en cápsulas cefálicas de cuarto estadio mostró diferencias estadísticamente significativas entre poblaciones, que se muestran en la figura a través de letras distintas sobre las barras del histograma de la figura.

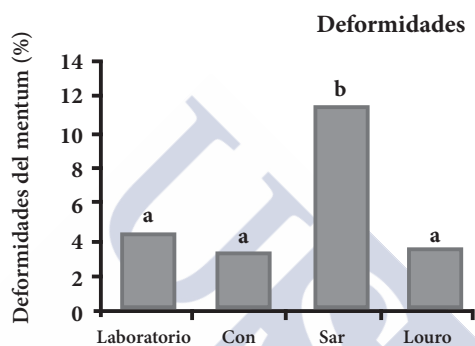


Figura 29. Porcentaje de deformidades en el mentum en larvas de cuarto estadio de *C. riparius* procedentes de cultivos de laboratorio (n=152) y poblaciones silvestres muestreadas en los ríos Con (n=182), Sar (n=174) y Louro (n=152). Diferentes letras indican diferencias entre grupos (p-valor < 0.05).

5.2. ESTUDIO ESTACIONAL

5.2.1. Parámetros fisicoquímicos

En el momento de la captura de las larvas de *P. olivacea* y *C. riparius* se tomaron también datos sobre algunos parámetros fisicoquímicos básicos: pH, temperatura del agua, concentración de oxígeno y conductividad, estos datos aparecen representados en la figura 30. Los resultados obtenidos se corresponden con lo esperado según las características y la ubicación de río: el pH se mantiene constante a lo largo del período de muestreo, la temperatura y la conductividad alcanzan sus máximos valores en los meses de verano al contrario que la saturación de oxígeno.

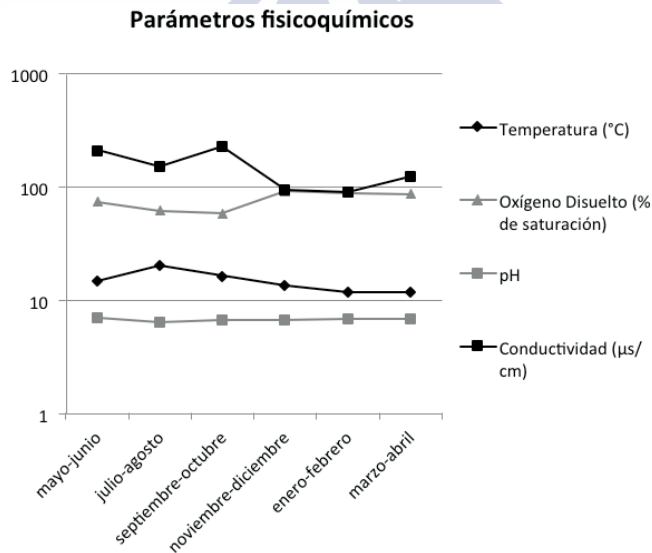


Figura 30. Parámetros fisicoquímicos tomados en la zona y el momento de cada muestreo.

A continuación se exponen los resultados obtenidos en los análisis de indicadores metabólicos (peso medio por larva, concentración de glucógeno, concentración de proteínas totales y relación RNA/DNA).

5.2.2. Peso medio por larva en *C. riparius*

Todas las muestras destinadas al análisis de marcadores energéticos se pesaron antes de ser congeladas. Los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Peso medio en mg de las larvas de *C. riparius* de cada réplica empleada en el estudio estacional y parámetros estadísticos básicos de las mismas.

Muestra	May-jun	Jul-ago	Sep-oct	Nov-dic	Ene-feb	Mar-abr
1	5.44	3.66	5.12	7.84	10.26	9.22
2	7.12	4.70	5.52	7.32	8.10	9.80
3	6.80	3.44	6.47	8.60	8.04	7.94
4	5.88	5.80	4.54	7.04	8.38	10.40
5	6.52	3.54	5.32	13.22	9.92	7.48
6	8.1	6.08	5.8	13.6	8.76	10.1
7	7.12	4.38	5.6	11.3	8.76	6.48
8	7.28	4.64	13.78	10.38	7.22	8.1
9	6.76	4.98	3.12	6.52	10.14	8.88
10	7.34	3.72	2.6	10.56	8.5	9.92
11	5.42	2.46	5.38	8.34	7.66	8.08
Media	6.71	4.31	5.75	9.52	8.70	8.76
Mediana	6,8	4,38	5,38	8,6	8,5	8,88
Error típico	0.25	0.32	0.87	0.74	0.30	0.38
Mínimo	5.42	2.46	2.6	6.52	7.22	6.48
Máximo	8.1	6.08	13.78	13.6	10.26	10.4
N total	55	54	53	55	55	55

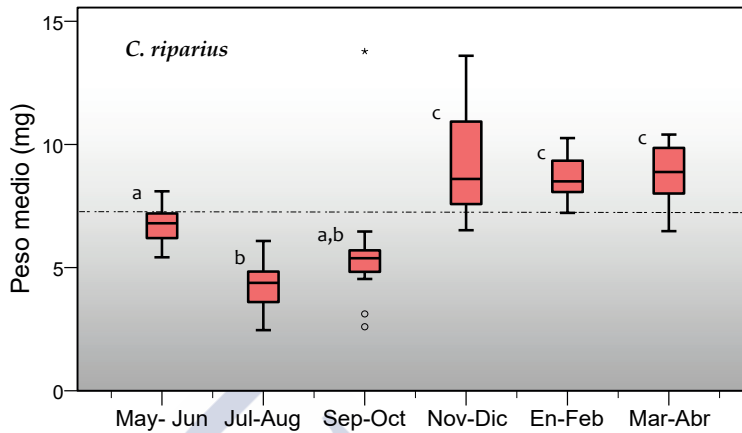


Figura 31. Diagrama de cajas (valores máximos y mínimos, cuartiles y mediana), de los valores de concentración de glucógeno, en función de la fase de desarrollo, obtenidos en *C. riparius*. Los valores se expresan en mg de glucógeno por gramo de muestra. La línea de puntos marca la mediana de la muestra total. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticamente significativas según el test de Mann-Whitney (p -valor <0.05).

Los datos fueron tratados con métodos estadísticos no paramétricos ya que no cumplieron los requisitos de normalidad y homocedasticidad.

Se compararon los pesos medios por larva de *C. riparius* de las muestras de todos los bimestres utilizando el test de Kruskal-Wallis, el resultado fue la confirmación de que existen diferencias entre bimestres ($K= 43.140$; p -valor $=0.000$). Las diferencias entre muestras -observables en la figura 31 fueron confirmadas estadísticamente con el test de Mann-Whitney. Así, se diferencian claramente las muestras de los meses más fríos (de noviembre a abril en las que los valores superan la mediana), mientras que las muestras de los meses restantes muestran un peso medio por larva menor a la mediana del total.

5.2.3. Peso medio por larva en *P. olivacea*

Se calcularon los pesos medios de las larvas de *P. olivacea* empleadas para la determinación de indicadores metabólicos. Los resultados se muestran en la tabla 14 y la figura 32.

Tabla 14. Peso medio en mg de las larvas de *P. olivacea* y parámetros estadísticos básicos de las mismas.

Muestra	May-jun	Jul-ago	Sep-oct	Nov-dic	Ene-feb	Mar-abr
1	6.40	2.88	3.67	6.76	10.18	9.10
2	4.10	3.10	3.37	4.35	10.60	8.98
3	5.30	2.82	2.67	3.44	11.10	7.40
4	7.14	2.84	5.08	5.16	6.12	5.60
5	4.60	2.80	4.30	3.20	6.60	7.64
6	4.36	3.08	4.18	5.38	6.92	6.80
7	3.86	3.24	4.38	5.14	8.66	8.00
8	4.58	3.50	3.24	3.24	5.94	8.50
9	6.18	2.72	4.36	3.64	9.06	7.80
10	3.48	2.78	-	-	6.02	6.70
11	4.56	2.86	-	-	6.66	-
12	4.00	-	-	-	6.12	-
13	4.90	-	-	-	-	-
14	4.10	-	-	-	-	-
Media	4.83	2.97	3.92	4.48	7.83	7.65
Mediana	0.28	0.07	0.25	0.41	0.57	0.34
Error típico	4.57	2.86	4.18	4.35	6.79	7.72
Mínimo	3.48	2.72	2.67	3.20	5.94	5.60
Máximo	7.14	3.50	5.08	6.76	11.10	9.10
N total	70	54	39	44	60	50

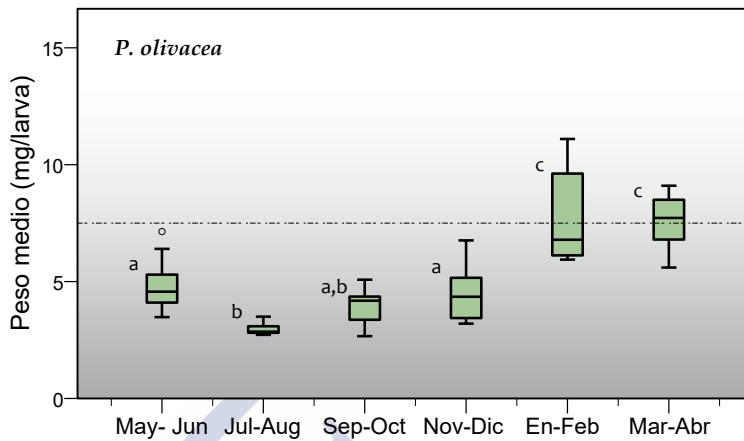


Figura 32. Diagrama de cajas (valores máximos y mínimos, cuartiles y mediana), de los pesos medios, en función de la época del año, obtenidos en *P. olivacea*. Los valores se expresan en mg por larva. La línea de puntos marca la mediana de la muestra total. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticamente significativas según el test de Mann-Whitney (p -valor < 0.05).

La distribución de los datos resultó ser no normal y por lo tanto se empleó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para confirmar que existían diferencias entre bimestres ($K = 49.00$, p -valor < 0.001). El test de Mann-Whitney estableció las diferencias entre grupos, las muestras de los bimestres de enero-febrero y marzo-abril son estadísticamente diferentes de todos los demás y presentan los mayores valores de peso medio. También es destacable el bimestre de julio-agosto, cuyos valores de peso medio son los menores y se diferencian estadísticamente de todos los demás excepto de los de septiembre-octubre.

5.2.4. Concentración tisular de glucógeno en *C. riparius*

Los valores de glucógeno por gramo de muestra fresca obtenidos en *C. riparius* -tabla 15- revelan una clara estacionalidad de la concentración tisular de este indicador metabólico

Tabla 15. Concentraciones de glucógeno en mg de glucógeno por gramo de muestra y estadísticos correspondientes obtenidos en larvas de cuarto estadio de *C. riparius* según bimestre.

Muestra	May-jun	Jul-ago	Sep-oct	Nov-dic	Ene-feb	Mar-abr
1	10.03	8.96	8.57	17.74	16.41	16.53
2	13.88	13.10	12.17	15.76	18.89	18.00
3	11.01	5.40	16.98	14.55	18.80	18.02
4	9.54	6.55	14.56	17.54	19.47	15.32
Media	11.11	8.50	13.07	16.40	18.39	16.97
Mediana	0.97	1.70	1.79	0.76	0.68	0.65
Error típico	10.52	7.75	13.36	16.65	18.84	17.26
Mínimo	9.54	5.40	8.57	14.55	16.41	15.32
Máximo	13.88	13.10	16.98	17.74	19.47	18.02
N total	20	19	18	20	20	20

Los valores de glucógeno por gramo de muestra fresca obtenidos en *C. riparius* revelan una clara estacionalidad de la concentración tisular de este indicador metabólico. Los resultados de las pruebas estadísticas de normalidad y homocedasticidad determinaron el uso de estadística no paramétrica. El test de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas entre bimestres ($K= 17.20$, $p\text{-valor} = 0.004$).

Después de detectar la existencia de diferencias significativas se trató de localizar dichas diferencias dentro del conjunto de submuestras a través del test de Mann-Whitney; en la figura 33 podemos observar los resultados obtenidos en forma de letras sobre los diagramas. Así, tanto con la representación gráfica, como con los resultados de los test estadísticos, quedan patentes las diferencias entre meses fríos –de noviembre a abril– y los cálidos –de mayo a agosto–. El bimestre septiembre–octubre no se diferencia estadísticamente de ninguno de los dos grupos anteriores, parece ser un periodo de transición entre ambas situaciones comentadas.

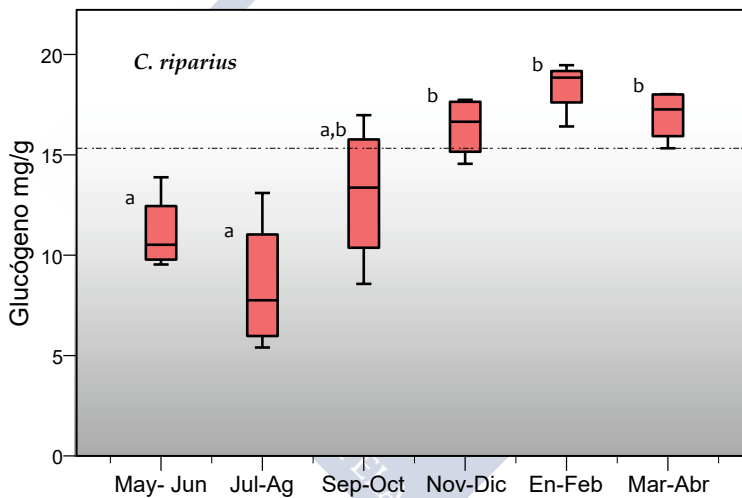


Figura 33. Diagrama de cajas (valores máximos y mínimos, cuartiles y mediana), de los valores de concentración de glucógeno, en función de la época del año, obtenidos en *C. riparius*. Los valores se expresan en mg de glucógeno por gramo de muestra. La línea de puntos marca la mediana de la muestra total. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticamente significativas según el test de Mann-Whitney (p -valor <0.05).

5.2.5. Concentración tisular de glucógeno en *P. olivacea*

Los valores de glucógeno por gramo de muestra fresca obtenidos en *P. olivacea* se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Concentraciones de glucógeno en mg de glucógeno por gramo de muestra y estadísticos correspondientes obtenidos en larvas de cuarto estadio de *P. olivacea* según bimestre.

Muestra	May-jun	Jul-ago	Sep-oct	Nov-dic	Ene-feb	Mar-abr
1	1.17	1.98	6.37	8.32	9.03	17.73
2	3.92	6.73	3.12	2.00	10.08	15.87
3	3.48	4.37	2.23	7.98	10.46	14.87
4	10.22	1.42	1.59	-	1.25	8.71
5	4.63	1.49	-	-	2.52	-
6	-	-	-	-	10.19	-
Media	4.69	3.20	3.33	6.10	7.26	14.29
Mediana	1.50	1.03	1.06	2.05	1.72	1.95
Error típico	3.92	1.98	2.67	7.98	9.56	15.37
Mínimo	1.17	1.42	1.59	2.00	1.25	8.71
Máximo	10.22	6.73	6.37	8.32	10.46	17.73
N total	25	25	14	14	30	19

El análisis estadístico no paramétrico de los resultados de concentración de glucógeno obtenidos en *P. olivacea*, determinó diferencias significativas entre bimestres ($K= 11.22$, $p\text{-valor}=0.047$), tal y como se refleja en la figura 34. El test de Mann-Whitney, utilizado para la comparación entre bimestres, señaló diferencias entre la submuestra de marzo-abril y todas las demás, salvo la de enero-febrero, que es estadísticamente similar tanto a marzo-abril como al resto de bimestres.

Al comparar estos resultados con los de *C. riparius*, se observa cierto paralelismo: la concentración es mínima en los meses cercanos al verano, de mayo a octubre, y sigue una suave tendencia ascendente de otoño a primavera. Sin embargo, existen también notables diferencias entre ambas especies. *P. olivacea* presenta una menor concentración de glucógeno, como revela la mediana representada en las gráficas de las figuras 34 y 35. Otra diferencia es el momento y el modo en el que la concentración de este indicador cambia de valores máximos a mínimos y viceversa. En *C. riparius* las transiciones son más suaves y progresivas y se producen antes que en *P. olivacea*; si consideráramos como un período de transición en *C. riparius* el bimestre septiembre-octubre, en *P. olivacea* ese período se retrasa hasta enero-febrero.

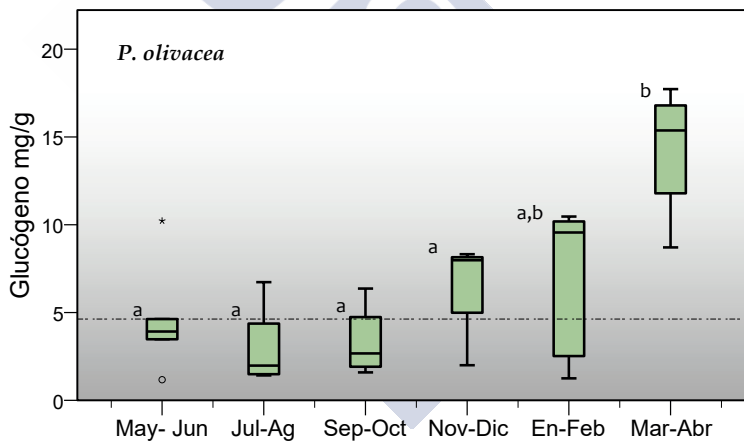


Figura 34. Diagrama de cajas (valores máximos y mínimos, cuartiles y mediana), de los valores de concentración de glucógeno, en función de la época del año, obtenidos en *P. olivacea*. Los valores se expresan en mg de glucógeno por gramo de muestra. La línea de puntos marca la mediana. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticamente significativas según el test de Mann-Whitney (p -valor <0.05).

5.2.6. Concentración tisular de proteínas totales en *C. riparius*

Los valores de proteínas por gramo de muestra fresca obtenidos en *C. riparius* y los parámetros estadísticos básicos calculados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Concentraciones de proteínas en mg de proteínas por gramo de muestra y estadísticos correspondientes obtenidos en larvas de cuarto estadio de *Chironomus riparius* según bimestre.

Muestra	May-jun	Jul-ago	Sep-oct	Nov-dic	Ene-feb	Mar-abr
1	37.49	31.16	37.37	20.96	46.89	54.30
2	32.65	28.19	31.51	22.57	48.96	54.15
3	36.96	27.15	33.89	27.00	44.01	57.76
4	33.98	35.41	19.46	39.61	51.42	45.94
Media	35.27	30.48	30.56	27.53	47.82	53.04
Mediana	1.17	1.85	3.89	4.22	1.57	2.51
Error típico	35.47	29.67	32.70	24.79	47.92	54.23
Mínimo	32.65	27.15	19.46	20.96	44.01	45.94
Máximo	37.49	35.41	37.37	39.61	51.42	57.76
N total	20	20	20	20	20	20

La cuantificación de la concentración de proteínas totales en *C. riparius* refleja un patrón temporal evidente de este indicador metabólico. Los resultados de las pruebas estadísticas de normalidad y homocedasticidad determinaron el uso de estadística no paramétrica. El test de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas entre bimestres ($K= 17.08$, $p\text{-value} = 0.004$).

Se localizaron las diferencias entre submuestras a través del test de Mann-Whitney; en la figura 35 se muestran los resultados obtenidos en forma de letras sobre los diagramas. En función del bimestre se observan dos períodos bien delimitados: uno con valores mínimos en la concentración de proteínas que va desde mayo a diciembre, y otro comprendido entre diciembre y abril, cuyas concentraciones son significativamente superiores. A grandes rasgos, los patrones estacionales de glucógeno y proteínas en *C. riparius* guardan cierta similitud –máximos valores en invierno y mínimos en verano–. Sin embargo, los cambios entre los dos grupos diferenciados estadísticamente son más pronunciados en la concentración de proteínas que en la de glucógeno.

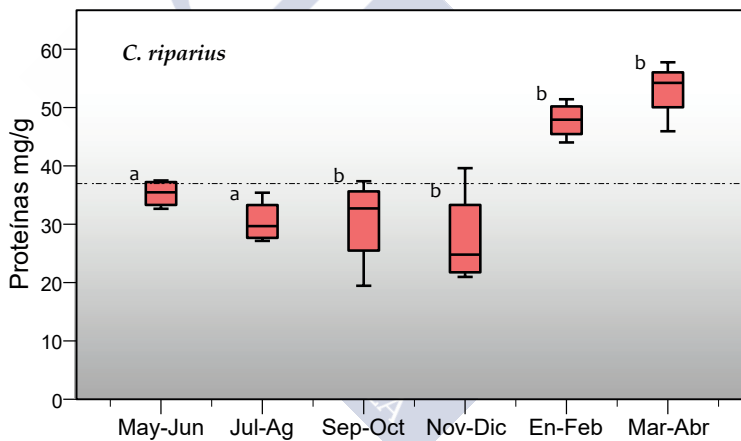


Figura 35. Diagrama de cajas (valores máximos y mínimos, cuartiles y mediana), de los valores de concentración de proteínas, en función de la época del año, obtenidos en *C. riparius*. Los valores se expresan en mg de glucógeno por gramo de muestra. La línea de puntos marca la mediana de la muestra total. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticamente significativas según el test de Mann-Whitney (p -valor < 0.05).

5.2.7. Concentración tisular de proteínas totales en *P. olivacea*

Los valores de proteínas por gramo de muestra fresca obtenidos en *P. olivacea* y los parámetros estadísticos básicos calculados se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Concentraciones de proteínas en mg de proteínas por gramo de muestra y estadísticos correspondientes obtenidos en larvas de cuarto estadio de *P. olivacea* según bimestre.

Muestra	May-jun	Jul-ago	Sep-oct	Nov-dic	Ene-feb	Mar-abr
1	33.89	36.65	53.00	37.97	43.75	48.04
2	37.01	45.08	52.89	41.96	41.60	63.67
3	37.54	32.27	-	34.75	43.04	49.98
4	42.76	-	-	-	-	-
5	50.25	-	-	-	-	-
6	45.29	-	-	-	-	-
Media	41.12	38.00	52.94	38.23	42.80	53.90
Mediana	2.49	3.76	0.06	2.09	0.63	4.92
Error típico	40.15	36.65	52.94	37.97	43.04	49.98
Mínimo	33.89	32.27	52.89	34.75	41.60	48.04
Máximo	50.25	45.08	53.00	41.96	43.75	63.67
N total	30	15	10	15	15	15

Los datos sobre concentración de proteínas totales a lo largo del año en *P. olivacea* son relativamente homogéneos. Gráficamente no se observa ninguna tendencia o patrón estacional reconocible ellos en la figura 36. Estadísticamente tampoco se hayaron diferencias significativas después de aplicar el test de Kruskal-Wallis ($K = 10.890$, p -valor = 0.054).

La prácticamente nula variabilidad de este parámetro en la muestra de septiembre-octubre podría estar provocada por el pequeño tamaño muestral; ya que, debido a la escasez de larvas en esa época y tramo de río, sólo se realizaron dos extracciones de proteínas con cuatro larvas cada una y no tres extracciones de cinco larvas como en el resto de casos.

A pesar de la falta de diferencias estadísticamente significativas, existen ciertos aspectos destacables de los resultados obtenidos. El máximo valor en la concentración de proteínas corresponde con la muestra de marzo-abril, como ocurre con el glucógeno en esta especie o las proteínas totales en *C. riparius*. Asimismo, siguiendo la tendencia descrita anteriormente en lo referente al glucógeno en ambas especies y a las proteínas en *C. riparius*, las medianas de las muestras de los meses más cálidos –exceptuando la de septiembre-octubre– se sitúan por debajo de la mediana muestral total.

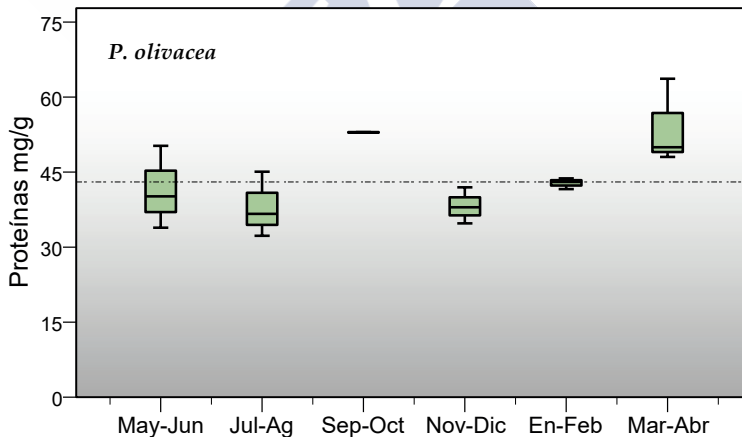


Figura 36. Diagrama de cajas (valores máximos y mínimos, cuartiles y mediana), de los valores de concentración de proteínas, en función de la época del año, obtenidos en *P. olivacea*. Los valores se expresan en mg de proteínas por gramo de muestra. La línea de puntos marca la mediana.

5.2.8. Relación RNA/DNA en *C. riparius*

Los valores de la relación RNA/DNA obtenidos en *C. riparius* y los parámetros estadísticos básicos calculados se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Valores de la relación RNA/DNA y estadísticos correspondientes obtenidos en larvas de cuarto estadio de *C. riparius* según bimestre.

Muestra	May-jun	Jul-ago	Sep-oct	Nov-dic	Ene-feb	Mar-abr
1	2.66	5.61	3.04	7.32	1.83	2.68
2	2.69	6.10	8.85	7.76	7.12	2.41
3	1.05	3.94	4.85	3.82	3.28	2.54
Media	41.12	38.00	52.94	38.23	42.80	53.90
Mediana	2.49	3.76	0.06	2.09	0.63	4.92
Error típico	40.15	36.65	52.94	37.97	43.04	49.98
Mínimo	33.89	32.27	52.89	34.75	41.60	48.04
Máximo	50.25	45.08	53.00	41.96	43.75	63.67
N total	30	15	10	15	15	15

La relación RNA/DNA en *C. riparius* a lo largo del año de estudio no mostró diferencias significativas según el test estadístico correspondiente; en este caso, al determinarse las muestras como no normales, se empleó el estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis ($K = 10'263$ p-valor = 0.068).

A pesar de no mostrar diferencias estadísticamente significativas, parece que los datos de relación RNA/DNA en esta especie guardan cierta semejanza con los otros indicadores metabólicos analizados. Los valores correspondientes a los meses considerados más fríos, de noviembre a abril, se sitúan por encima de la mediana, mientras que los de los meses cálidos, de julio a octubre, lo hacen por debajo. Los datos de mayo-junio muestran

una gran variabilidad. A pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas al observar los datos no se puede afirmar que no exista variabilidad estacional.

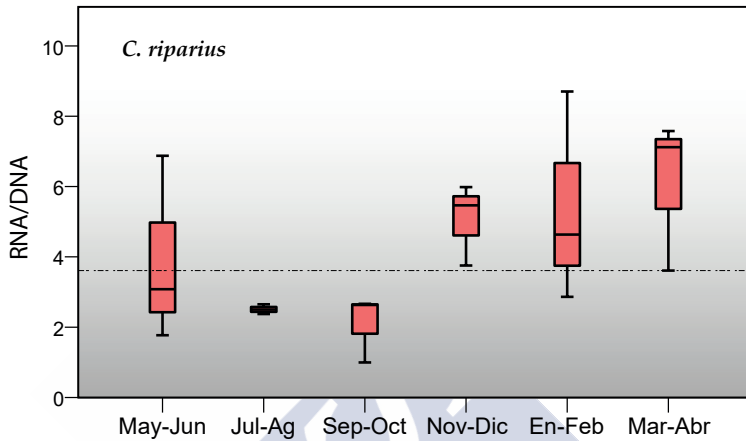


Figura 37. Diagrama de cajas (valores máximos y mínimos, cuartiles y mediana) de los valores de la relación RNA/DNA, en función de la época del año, obtenidos en *C. riparius*. Los valores se expresan en mg de glucógeno por gramo de muestra. La línea de puntos marca la mediana de la muestra total.

5.2.9. Relación RNA/DNA en *P. olivacea*

Los valores de la relación RNA/DNA obtenidos en *P. olivacea* y los parámetros estadísticos básicos calculados se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Valores de la relación RNA/DNA y estadísticos correspondientes obtenidos en larvas de cuarto estadio de *P. olivacea* según bimestre.

Muestra	May-jun	Jul-ago	Sep-oct	Nov-dic	Ene-feb	Mar-abr
1	8.50	1.78	2.68	9.18	8.58	7.51
2	6.18	2.73	1.60	7.52	11.98	9.34
3	4.69	3.29	5.40	7.83	11.43	5.86
Media	6.46	2.60	3.23	8.18	10.66	7.57
Mediana	1.11	0.44	1.13	0.51	1.05	1.00
Error típico	6.18	2.73	2.68	7.83	11.43	7.51
Mínimo	4.69	1.78	1.60	7.52	8.58	5.86
Máximo	8.50	3.29	5.40	9.18	11.98	9.34
N total	15	15	15	15	15	15

Los resultados obtenidos en cada bimestre aparecen reflejados en la figura 38. Los datos se analizaron con estadística no paramétrica al no ajustarse a una normal su distribución. El test de Kruskal-Wallis reveló que existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras.

Se aplicó el estadístico U de Mann-Whitney para encontrar las diferencias entre bimestres. Los resultados revelaron diferencias entre los meses estivales y los invernales, principalmente entre la submuestra de julio-agosto y las de noviembrediciembre y enero-febrero. Además de la relevancia estadística resulta muy informativa la representación gráfica

de la figura 38, que los datos estadísticos. En ella se aprecia la posición por debajo de la mediana, de prácticamente todos los datos de los meses comprendidos entre mayo y octubre; y la situación opuesta en los otros seis meses. Además se observa una transición lineal, suave y progresiva entre el máximo y el mínimo, sin grandes variaciones entre bimestres consecutivos.

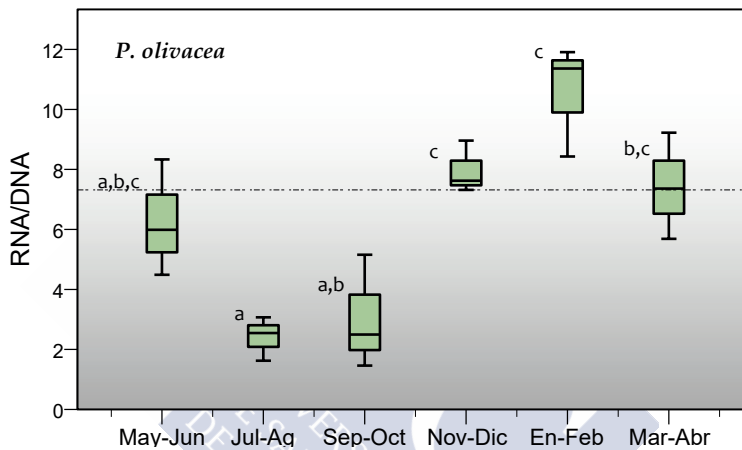


Figura 38. Diagrama de cajas (valores máximos y mínimos, cuartiles y mediana), de los valores de la relación RNA/DNA, en función de la época del año, obtenidos en *P. olivacea*. La línea de puntos marca la mediana. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticamente significativas según el test de Mann-Whitney (p -valor <0.05).

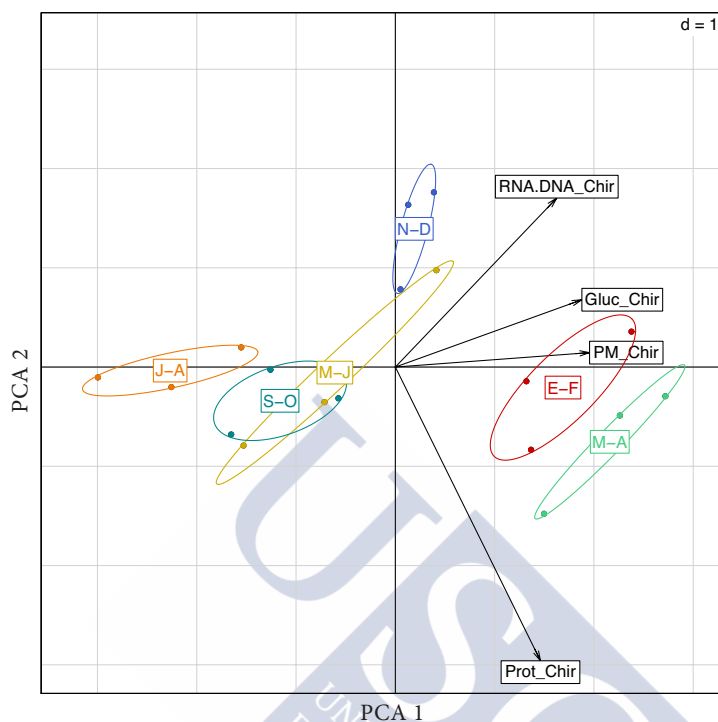


Figura 39. Análisis de Componentes Principales (PCA) que integra todos los indicadores metabólicos estudiados en *C. riparius* empleando como variable de agrupación los bimestres

Se realizaron sendos análisis de componentes principales (PCA), uno para cada especie, integrando todos los indicadores metabólicos y empleando como variable de agrupación los bimestres. En el PCA de *C. riparius* (figura 39) se aprecia una separación preponderante en el eje de abscisas, dominado por el peso medio y el glucógeno. Los meses invernales (enero-febrero y marzo-abril) se ubican en el extremo de máximos valores y el bimestre de julio-agosto en el de mínimos. Es subrayable también el desplazamiento en el sentido de las ordenadas del bimestre noviembre-diciembre con respecto a todos los demás, debido a la influencia de la baja concentración de proteínas y a los altos valores de glucógeno y peso medio de las muestras de esa época.

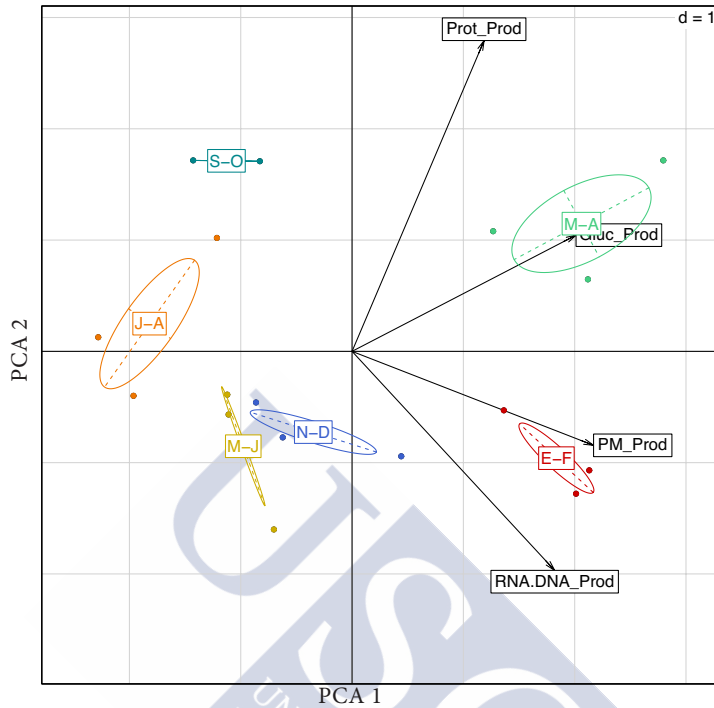


Figura 40. Análisis de Componentes Principales (PCA) que integra todos los indicadores metabólicos estudiados en *P. olivacea* empleando como variable de agrupación los bimestres

En la figura 40 se muestra el PCA obtenido para *P. olivacea*, la situación tanto en las variables dominantes como en la distribución de las muestras, pero en este caso las variables dominantes en el eje de ordenadas, la relación RNA/DNA y la concentración de proteínas, separan más las muestras en este sentido luego los valores de estos indicadores son menos parecidos entre bimestres, poseen mayor variabilidad estacional que los en el caso de *C. riparius*.

5.3. ESTUDIO ONTOGÉNICO

Los datos de peso medio por larva fueron tratados con métodos estadísticos no paramétricos ya que no cumplieron los requisitos de normalidad y homocedasticidad.

5.3.1. Peso medio por larva en *C. riparius*

En la la tabla 21 se muestran los pesos medios de las larvas y pupas de *C. riparius* empleadas en el estudio ontogénico.

Tabla 21. Peso medio en mg de las pupas y larvas de *C. riparius* de cada muestra empleada en el estudio en función de la clase de desarrollo y estadísticos correspondientes.

Muestra	I-II	III-IV	V-VI	VII-VIII	IX	Pupa
1	2.63	4.23	6.78	7.25	6.55	6.20
2	2.63	3.50	5.18	7.90	8.25	5.75
3	2.78	3.65	5.60	7.25	6.73	4.85
4	2.98	3.65	5.55	7.10	4.50	4.33
5	2.40	4.90	5.33	6.73	7.65	4.28
6	2.10	3.13	6.10	5.50	7.10	4.75
7	3.60	3.60	5.60	5.20	7.15	7.15
8	2.28	3.23	5.00	5.23	4.58	5.00
9	3.33	3.88	6.98	5.25	5.00	5.63
Media	2.74	3.75	5.79	6.38	6.39	5.33
Mediana	0.16	0.18	0.23	0.36	0.46	0.31
Error típico	2.63	3.65	5.60	6.73	6.73	5.00
Mínimo	2.10	3.13	5.00	5.20	4.50	4.28
Máximo	3.60	4.90	6.98	7.90	8.25	7.15
N total	36	36	36	36	30	36

El peso medio de las larvas de *Chironomus riparius* mostró diferencias estadísticamente significativas entre fases de desarrollo a lo largo del último estadio larvario según el test de Kruskal-Wallis.

Para localizar entre que fases existían diferencias significativas se utilizó el test estadístico U de Mann-Whitney, los resultados obtenidos aparecen representados en la figura 41 en forma de letras. En líneas generales se aprecia un incremento aproximadamente lineal y significativo entre fases en el peso de las larvas hasta que estas alcanzan la clase de desarrollo VII-VIII, a partir de este punto el incremento se detiene e incluso comienza una ligera merma en el peso medio.

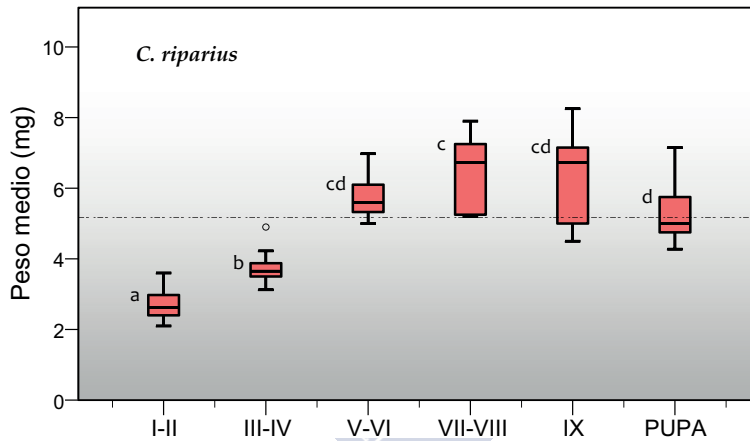


Figura 41. Diagrama de cajas (valores máximos y mínimos, cuartiles y mediana), de los valores de peso medio, en función de la clase de desarrollo, obtenidos en *C. riparius*. Los valores se expresan en mg por individuo. La línea de puntos marca la mediana de la muestra total. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticamente significativas según el test de Mann-Whitney (p -valor < 0.05).

5.3.2. Peso medio por larva en *P. olivacea*

En la la tabla 22 se muestran los pesos medios de las larvas y pupas de *P. olivacea* empleadas en el estudio ontogénico.

Tabla 22. Peso medio en mg de las pupas y larvas de *P. olivaceas* de cada muestra empleada en el estudio en función de la clase de desarrollo y estadísticos correspondientes.

Muestra	I-II	III-IV	V-VI	VII-VIII	IX	Pupa
1	2.33	4.38	6.20	5.25	4.18	3.83
2	2.15	4.63	2.55	4.88	4.70	4.20
3	2.60	4.98	7.05	4.83	5.98	4.08
4	3.35	5.35	5.63	5.98	5.15	5.25
5	2.73	5.33	5.60	5.73	5.40	4.75
6	2.68	5.90	6.73	3.85	7.53	4.58
7	5.35	5.43	7.35	7.83	4.85	5.18
8	3.93	6.40	6.53	6.38	10.47	4.00
9	2.78	5.70	-	4.75	-	-
Media	3.10	5.34	5.95	5.49	6.03	4.48
Mediana	0.33	0.21	0.53	0.38	0.73	0.19
Error típico	2.73	5.35	6.36	5.25	5.28	4.39
Mínimo	2.15	4.38	2.55	3.85	4.18	3.83
Máximo	5.35	6.40	7.35	7.83	10.47	5.25
N total	34	34	30	34	27	32

Los valores de peso medio por larva según clase de desarrollo en *P. olivacea* se trataron con métodos estadísticos no paramétricos al no cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

El test de Kruskal-Wallis desveló la existencia de diferencias entre fases y la prueba de Mann-Whitney detectó entre qué fases existían diferencias estadísticamente significativas.

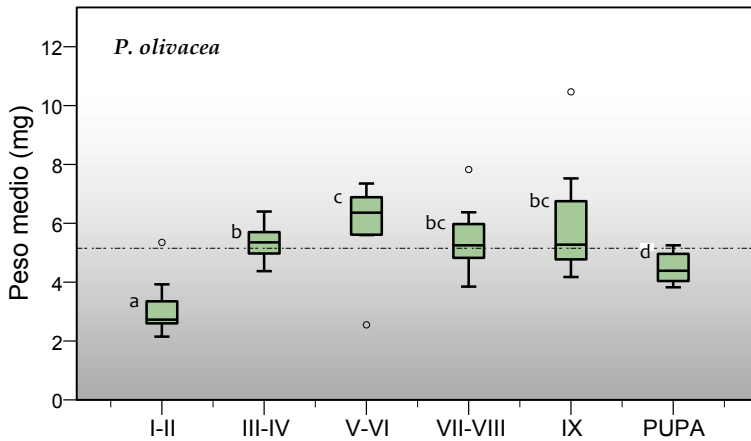


Figura 42. Diagrama de cajas (valores máximos y mínimos, cuartiles y mediana), de los valores de peso medio, en función de la clase de desarrollo, obtenidos en *P. olivacea*. Los valores se expresan en mg por individuo. La línea de puntos marca la mediana de la muestra total. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticamente significativas según el test de Mann-Whitney (p -valor <0.05).

En la figura 42 se observa como el peso medio en larvas de *P. olivacea* aumenta de manera significativa de la clase I-II a la V-VI. Después de ese punto el peso medio deja de aumentar y se mantiene estable en las clases VII-VIII y IX; en la fase de pupa se reduce hasta valores menores a los observados en la clase III-IV.

5.3.3. Concentración tisular de glucógeno en *C. riparius*

En la la tabla 23 se muestran los valores de concentración de glucógeno en mg por g de tejido frescode las larvas y pupas de *C. riparius* empleadas en el estudio ontogénico.

Tabla 23. Concentración de glucógeno expresada en mg por g de tejido de *C. riparius* en función de la clase o fase de desarrollo y estadísticos correspondientes.

Muestra	I-II	III-IV	V-VI	VII-VIII	IX	Pupa
1	3.14	4.55	11.75	11.91	15.42	11.06
2	1.93	2.55	2.91	10.00	14.33	14.64
3	3.26	3.09	1.83	8.91	14.82	11.34
Media	2.77	3.39	5.50	10.27	14.86	12.35
Mediana	0.43	0.60	3.14	0.88	0.32	1.15
Error típico	3.14	3.09	2.91	10.00	14.82	11.34
Mínimo	1.93	2.55	1.83	8.91	14.33	11.06
Máximo	3.26	4.55	11.75	11.91	15.42	14.64
N total	12	12	12	12	8	12

Los valores de glucógeno obtenidos para larvas de *C. riparius* no cumplieron los requisitos de homocedasticidad y normalidad para el uso de estadística paramétrica por lo que se emplearon los test no paramétricos de Kruskal-Wallis y de Mann-Whitney para confirmar la existencia de diferencias entre fases de desarrollo y localizar dichas diferencias.

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre submuestras correspondientes a fases consecutivas, pero sí entre las muestras correspondientes a las etapas iniciales (I-IV) y las correspondientes a las etapas finales (VII-IX) y a la fase de pupa (figura 43). Los niveles

de glucógeno al comienzo de cuarto estadio son mínimos; se mantienen así hasta las fases V-VI en la que aumentan rápidamente. Continúan aumentando hasta alcanzar el máximo en la fase IX y descienden ligeramente durante la pupación.

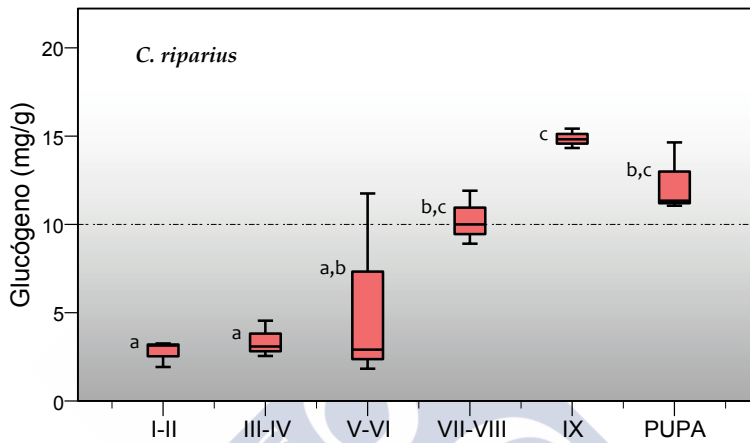


Figura 43. Diagrama de cajas (valores máximos y mínimos, cuartiles y mediana), de los valores de concentración de glucógeno, en función de la clase de desarrollo, obtenidos en *C. riparius*. Los valores se expresan en mg de glucógeno por gramo de muestra. La línea de puntos marca la mediana de la muestra total. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticamente significativas según el test de Mann-Whitney (p -valor <0.05).

5.3.4. Concentración tisular de glucógeno en *P. olivacea*

En la la tabla 24 se muestran los valores de concentración de glucógeno en mg por g de tejido frescode las larvas y pupas de *P. olivacea* empleadas en el estudio ontogénico.

Tabla 24. Concentración de glucógeno expresada en mg por g de tejido de *P. olivacea* en función de la clase o fase de desarrollo y estadísticos correspondientes.

Muestra	I-II	III-IV	V-VI	VII-VIII	IX	Pupa
1	0.22	0.39	0.19	0.61	1.97	0.88
2	0.25	0.33	0.39	0.47	0.88	0.98
3	0.25	0.22		0.61		
Media	0.24	0.31	0.29	0.56	1.43	0.93
Mediana	0.01	0.05	0.10	0.05	0.55	0.05
Error típico	0.25	0.33	0.29	0.61	1.43	0.93
Mínimo	0.22	0.22	0.19	0.47	0.88	0.88
Máximo	0.25	0.39	0.39	0.61	1.97	0.98
N total	12	12	8	12	8	8

Los datos de concentración de glucógeno según la fase de desarrollo en *P. olivacea* no cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad por lo que se emplearon métodos no paramétricos para su análisis estadístico.

La prueba de Kruskal-Wallis reveló diferencias estadísticamente significativas a lo largo del cuarto estadio larvario y la de Mann-Whitney nos ayudó a localizar entre qué submuestras se ubicaban dichas diferencias. Resultó que éstas se encuentran entre las muestras correspondientes a las fases I a IV y VII-VIII (figura 44).

Se aprecia claramente una tendencia ascendente durante todo el cuarto estadio larvario, alcanzando los máximos valores en la fase IX para descender de forma notable aunque no significativa, en la fase de pupa.

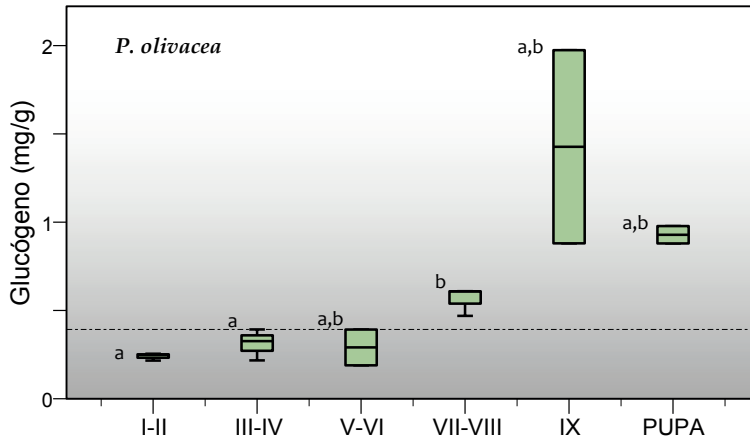


Figura 44. Diagrama de cajas (valores máximos y mínimos, cuartiles y mediana), de los valores de concentración de glucógeno, en función de la clase de desarrollo, obtenidos en *P. olivacea*. Los valores se expresan en mg de glucógeno por gramo de muestra. La línea de puntos marca la mediana de la muestra total. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticamente significativas según el test de Mann-Whitney (p -valor <0.05).

5.3.5. Concentración tisular de proteínas totales en *C. riparius*

En la la tabla 25 se muestran los valores de concentración de proteínas en mg por g de tejido frescode las larvas y pupas de *C. riparius* empleadas en el estudio ontogénico.

Tabla 25. Concentración de proteínas expresada en mg por g de tejido de *C. riparius* en función de la clase o fase de desarrollo y estadísticos correspondientes.

Muestra	I-II	III-IV	V-VI	VII-VIII	IX	Pupa
1	19.10	20.63	22.38	26.33	23.31	30.75
2	17.52	20.23	26.33	21.74	27.47	23.56
3	10.26	16.98	20.26	23.83	22.59	26.10
Media	15.63	19.28	22.99	23.97	24.46	26.80
Mediana	2.72	1.16	1.78	1.33	1.52	2.10
Error típico	17.52	20.23	22.38	23.83	23.31	26.10
Mínimo	10.26	16.98	20.26	21.74	22.59	23.56
Máximo	19.10	20.63	26.33	26.33	27.47	30.75
N total	12	12	12	12	12	12

Se empleó estadística no paramétrica para el análisis de la concentración de proteínas según la fase de desarrollo del cuarto estadio larvario de *C. riparius*, ya que la distribución de los datos no es normal ni homocedástica.

Según el test de Kruskal-Wallis existen diferencias estadísticamente significativas entre submuestras y según el test de Mann-Whitney dichas diferencias son más pronunciadas entre las submuestras de las etapas más tempranas (I-II y III-IV) y las de las más tardías (VII-VIII, IX y pupas)

(figura 45). A lo largo del cuarto estadio se aprecia un incremento progresivo en la concentración de proteínas; no hay diferencias significativas entre grupos consecutivos.

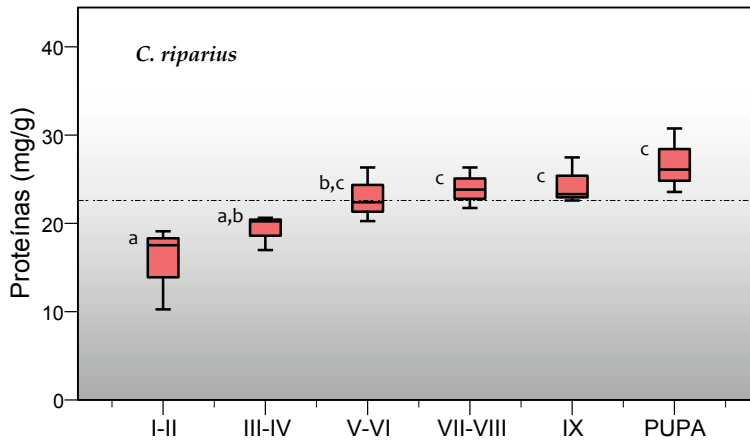


Figura 45. Diagrama de cajas (valores máximos y mínimos, cuartiles y mediana), de los valores de concentración de proteínas, en función de la clase de desarrollo, obtenidos en *C. riparius*. Los valores se expresan en mg de proteínas por gramo de muestra. La línea de puntos marca la mediana de la muestra total. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticamente significativas según el test de Mann-Whitney (p -valor <0.05).

5.3.6. Concentración tisular de proteínas totales en *P. olivacea*

En la la tabla 26 se muestran los valores de concentración de proteínas en mg por g de tejido frescode las larvas y pupas de *P. olivaceas* empleadas en el estudio ontogénico.

Tabla 26. Concentración de proteínas expresada en mg por g de tejido de *P. olivacea* en función de la clase o fase de desarrollo y estadísticos correspondientes.

Muestra	I-II	III-IV	V-VI	VII-VIII	IX	Pupa
1	39.46	58.32	46.16	47.61	42.73	37.48
2	38.13	43.57	47.63	44.19	46.04	44.70
3	28.00	53.45	47.84	38.38	39.78	53.29
Media	35.20	51.78	47.21	43.39	42.85	45.16
Mediana	3.62	4.34	0.53	2.70	1.81	4.57
Error típico	38.13	53.45	47.63	44.19	42.73	44.70
Mínimo	28.00	43.57	46.16	38.38	39.78	37.48
Máximo	39.46	58.32	47.84	47.61	46.04	53.29
N total	10	10	10	10	8	12

Los datos de concentración de proteínas en *P. olivacea* según la etapa de desarrollo fueron analizados con estadística no paramétrica ya que no cumplieron los supuestos de homocedasticidad y normalidad. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre submuestras (figura 46).

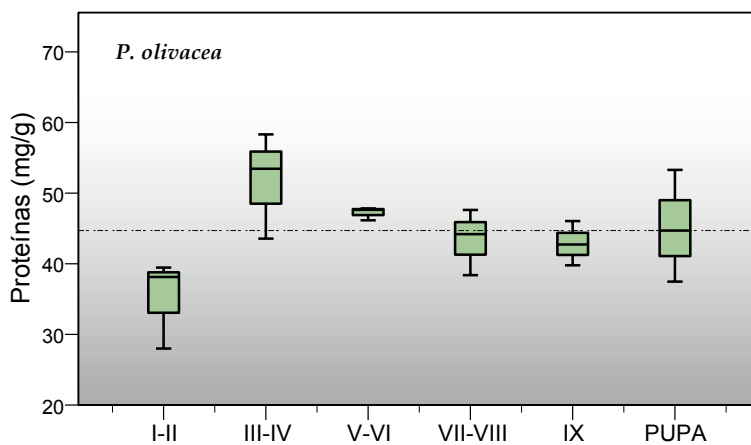


Figura 46. Diagrama de cajas (valores máximos y mínimos, cuartiles y mediana), de los valores de concentración de proteínas, en función de la clase de desarrollo, obtenidos en *P. olivacea*. Los valores se expresan en mg de proteínas por gramo de muestra. La línea de puntos marca la mediana de la muestra total.

5.3.7. Relación RNA/DNA en *C. riparius*

En la la tabla 27 se muestran los valores de la relación RNA/DNA de las larvas y pupas de *C. riparius* empleadas en el estudio ontogénico.

Tabla 27. Valores de la relación RNA/DNA en individuos de *C. riparius* en función de la clase o fase de desarrollo y estadísticos correspondientes.

Muestra	I-II	III-IV	V-VI	VII-VIII	IX	Pupa
1	2.95	4.63	7.53	6.32	2.74	2.36
2	3.87	2.85	6.31	7.84	1.76	1.92
3	4.36	4.78	2.39	5.83	2.80	1.55
Media	3.73	4.08	5.41	6.66	2.43	1.94
Mediana	0.41	0.62	1.55	0.61	0.34	0.24
Error típico	3.87	4.63	6.31	6.32	2.74	1.92
Mínimo	2.95	2.85	2.39	5.83	1.76	1.55
Máximo	4.36	4.78	7.53	7.84	2.80	2.36
N total	12	12	12	12	10	12

Los datos de relación RNA/DNA en las larvas y pupas de *C. riparius* según no cumplieron las premisas de homocedasticidad y normalidad.

Los test de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney mostraron diferencias significativas entre submuestras (figura 47). Se observa una tendencia al incremento de este indicador desde la muestra de la clase I-II hasta la muestra de las clase VII-VIII. A partir de ese punto la relación RNA/DNA desciende hasta valores inferiores a la mediana y a los correspondientes a las fases I-II.

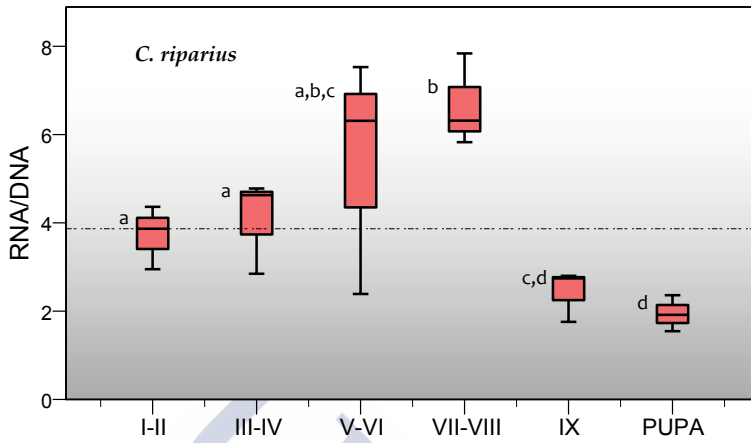


Figura 47. Diagrama de cajas (valores máximos y mínimos, cuartiles y mediana), de los valores de la relación RNA/DNA, en función de la clase de desarrollo, obtenidos en *C. riparius*. La línea de puntos marca la mediana de la muestra total. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticamente significativas según el test de Mann-Whitney (p -valor <0.05).

5.3.8. Relación RNA/DNA en *P. olivacea*

En la la tabla 28 se muestran los valores de la relación RNA/DNA de las larvas y pupas de de *P. olivacea* empleadas en el estudio ontogénico.

Tabla 28. Valores de la relación RNA/DNA en individuos de *P. olivacea* en función de la clase o fase de desarrollo y estadísticos correspondientes.

Muestra	I-II	III-IV	V-VI	VII-VIII	IX	Pupa
1	2.59	4.01	3.44	4.07	4.38	4.28
2	0.35	0.52	0.37	0.65	1.25	0.66
3	2.26	3.77	3.08	3.98	3.34	3.63
Media	2.59	4.08	5.41	6.66	2.43	1.94
Mediana	0.35	0.62	1.55	0.61	0.34	0.24
Error típico	2.26	4.63	6.31	6.32	2.74	1.92
Mínimo	2.22	3.24	3.06	3.00	2.94	3.60
Máximo	3.28	5.01	4.19	5.23	6.87	5.60
N total	12	12	12	12	11	12

Los datos de la relación RNA/DNA en *P. olivacea* según la fase de desarrollo fueron analizados con estadística no paramétrica ya que no cumplieron los supuestos de homocedasticidad y normalidad. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre submuestras (figura 48).

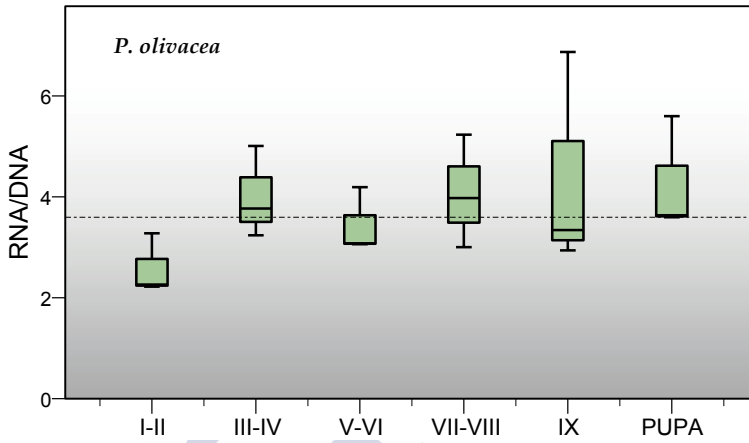


Figura 48. Diagrama de cajas (valores máximos y mínimos, cuartiles y mediana), de los valores de la relación RNA/DNA, en función de la clase de desarrollo, obtenidos en *P. olivacea*. La línea de puntos marca la mediana de la muestra total. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticamente significativas según el test de Mann-Whitney (p -valor <0.05).

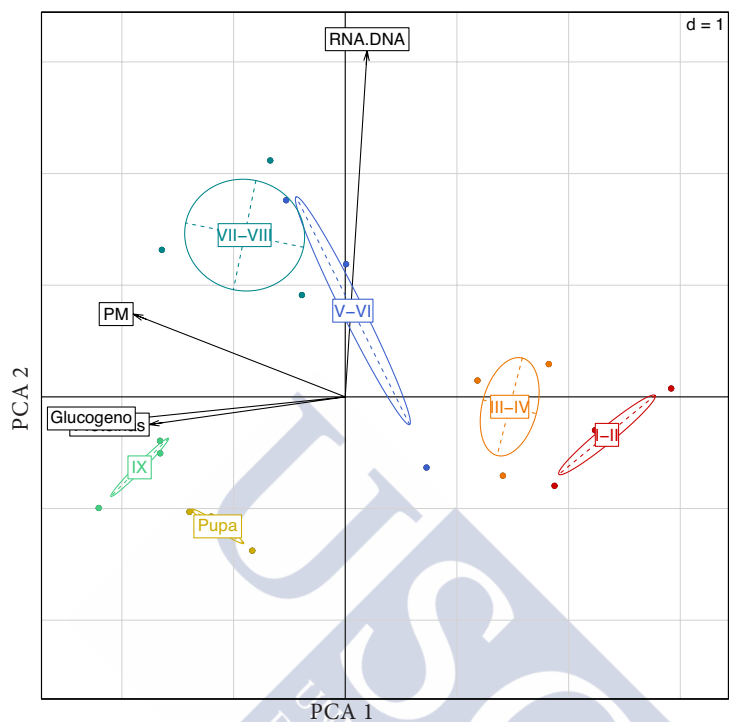


Figura 49. Análisis de Componentes Principales (PCA) que integra todos los indicadores metabólicos estudiados en *C. riparius* empleando como variable de agrupación los bimestres.

Se realizaron sendos análisis de componentes principales (PCA), uno para cada especie, integrando todos los indicadores metabólicos y empleando como variable de agrupación los las clases de desarrollo. En el PCA de *C. riparius* (figura 49) se aprecia una separación dominante en el eje de abscisas msrcada por la concentración de glucógeno. También se aprecia un desplazamiento en el sentido de las ordenadas debido a las diferencias en la relación RNA/DNA.

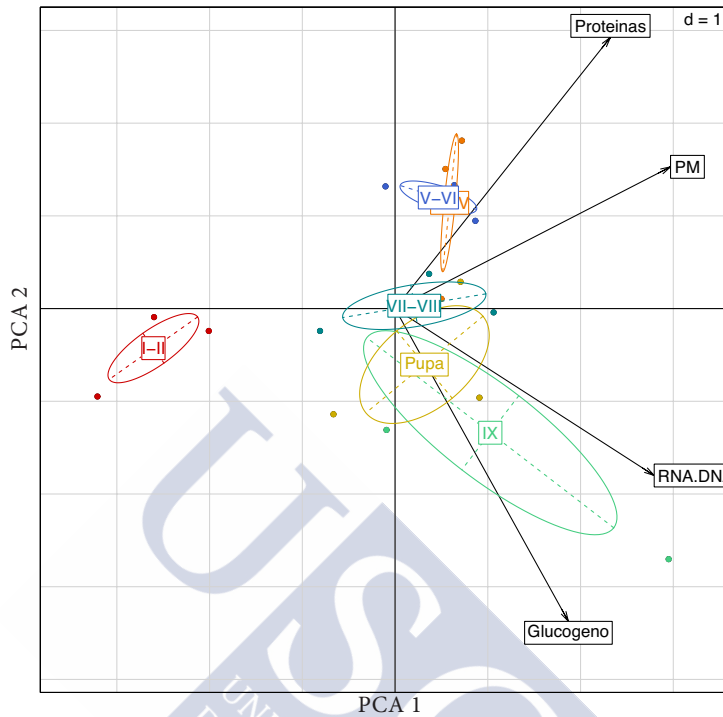


Figura 50. Análisis de Componentes Principales (PCA) que integra todos los indicadores metabólicos estudiados en *P. olivacea* empleando como variable de agrupación los bimestres.

En la figura 50 se muestra el PCA obtenido para *P. olivacea*, la situación tanto es claramente distinta a la de *C. riparius*, en este caso la diferenciación entre muestras sólo se puede apreciar entre las de la clase de desarrollo I-II y el resto, debido, eso sí a unos menores niveles de los indicadores estudiados.





CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN



6.1. ESTUDIO INTERPOBLACIONAL

Es imprescindible la validación de los biomarcadores en poblaciones de campo expuestas a mezclas complejas de contaminantes y a las condiciones naturales antes de sacar conclusiones sobre su utilidad para la evaluación ambiental en escenarios reales; aunque precisamente esa gran cantidad de agentes y la complejidad de las interacciones que pueden actuar sobre los biomarcadores dificulta el establecimiento de los factores causantes de los efectos observados en los biomarcadores. Trataremos en las páginas siguientes de dilucidar cuáles son las relaciones entre los biomarcadores y las condiciones ambientales de cada una de las poblaciones, tomando como referencia la población procedente del laboratorio y teniendo en cuenta que las diferencias ontogénicas y estacionales han sido evitadas en la medida de lo posible al realizar los muestreos en días consecutivos y al seleccionar larvas de la misma fase de desarrollo del cuarto estadio (V y VI según la clasificación de GOODEERIS *ET AL.*, 2001).

Aunque ninguna de las estaciones de muestreo mostró niveles elevados de contaminación de acuerdo con las guías de sedimentos de agua dulce de MACDONALD *ET AL.* (2000), al comparar el índice de contaminación relativa -calculado a partir del análisis cuantitativo de contaminantes- entre estaciones, se detectó una carga contaminante significativamente mayor en el río Sar, seguido por el Louro, en metales pesados y compuestos farmacéuticos en el agua y metales pesados en los sedimentos; mientras que en el río Con se encontraron las concentraciones de pesticidas

organoclorados significativamente más altas (figuras 18 y 19). El análisis cualitativo reveló la presencia de un número de sustancias contaminantes notablemente mayor en el Sar, tanto en el agua como en los sedimentos, siendo sólo igualado en algunas familias de contaminantes por el río Louro (figuras 20 y 21). Teniendo en cuenta estos datos se puede afirmar que la población del río Sar es la que está expuesta a una mayor carga contaminante en general, a excepción de la familia de los pesticidas, en la que es la estación del río Con la más expuesta. También en el contenido de materia orgánica en los sedimentos es la estación del Sar la que presentó una mayor carga (figura 22).

El estudio comparativo de la batería de biomarcadores reveló diferencias significativas en cuatro de los ocho parámetros analizados (gen HSP70, actividad enzimática de la GST, concentración de glucógeno y deformidades del mentum) entre las poblaciones de larvas de *Chironomus riparius*. Otros cuatro parámetros (gen HSC70, gen EcR, gen CYP4G y concentración de proteínas totales) se mantuvieron indistinguibles según las pruebas estadísticas incluso cuando se compararon con la población de laboratorio.

Una de las diferencias más notables se encontró en la expresión del gen HSP70. Las proteínas de choque térmico mantienen la integridad celular y se consideran comúnmente como un indicador del estrés celular. La familia incluye las proteínas constitutivas (HSC70), altamente abundantes en condiciones celulares normales, así como miembros inducibles (HSP70) presentes en condiciones estresantes provocadas por un amplio espectro de agentes. Se observó sobreexpresión significativa del gen HSP70 en las tres poblaciones silvestres muestreadas en

poblaciones los ríos Sar, Con y Louro en comparación con el cultivo de laboratorio; mientras que la expresión de HSC70 fue similar en las cuatro poblaciones; lo que sugiere que el HSC70 parece ser un gen relativamente estable en poblaciones naturales sometido a los efectos de diferentes mezclas de tóxicos. La estabilidad del gen HSC70 coincide con los resultados previos obtenidos tras exposiciones experimentales a una amplia variedad de productos químicos (MORALES *ET AL.*, 2011).

La temperatura es uno de los inductores más fuertes del gen HSP70, sin embargo la temperatura de los tres ríos analizados fue similar (alrededor de 16 °C) e incluso superior (20 °C) en el cultivo de laboratorio y no tenemos constancia de ningún tipo de impacto en ninguna de las estaciones que pudiese producir situaciones de choque térmico. Durante el transporte y la manipulación este parámetro se controló y se mantuvo estable mediante refrigeración cuando fue necesario. Por todo esto no es probable que la temperatura haya sido el inductor de la sobreexpresión de este gen en las larvas procedentes de poblaciones silvestres.

Se ha demostrado que la expresión del gen HSP70 de *Chironomus* es activada por exposiciones experimentales a diferentes sustancias tóxicas (MORALES *ET AL.*, 2011), plaguicidas (YOSHIMI *ET AL.*, 2002), bisfenol A (PLANELLÓ *ET AL.*, 2008), y los ftalatos (PARK & KWAK, 2008; PLANELLÓ *ET AL.*, 2011). También los metales son potentes inductores de proteínas de choque térmico (FREDJ *ET AL.*, 2010; GUO & KI, 2012), y se ha comprobado que la exposición al cobre, cadmio, plomo y cromo activa el gen HSP70 en *Chironomus* (KAROUNA-RENIER & ZEHR, 2003; LEE *ET AL.*, 2006; PLANELLÓ *ET AL.*, 2010).

Es posible entonces, que las diferencias de los niveles de HSP70 entre las

poblaciones silvestres y entre éstas y la de laboratorio esté relacionada con la presencia de la amplia gama de contaminantes orgánicos y metálicos en los sedimentos de los ríos, Sin embargo, de ser esta la única causa, resulta llamativo notar que los niveles más altos de HSP70 se encontraron en larvas de la muestra del río Con, precisamente la estación en la que tanto la carga contaminante como la cantidad de materia orgánica es menor. Estos datos reflejan la compleja situación que tiene lugar en los ecosistemas de agua dulce, como en muchos otros, en los que las interacciones sinérgicas y antagónicas y sus aportes al medio natural no sólo abarcan su estado puro, sino también el de otros productos como resultado de la degradación (HASSAN *ET AL.*, 2005).

Los sistemas de detoxificación de organismos desempeñan un papel central en la defensa contra diversos tóxicos ambientales y pueden conducir a los organismos a la adaptación a exposiciones crónicas en ambientes contaminados. Las glutatión S-transferasas son enzimas de detoxificación de fase II cuyos niveles de GST responden selectivamente a diferentes xenobióticos. Mientras que la tributiltina inhibe tanto la enzima GST como el gen CYP, el nonilfenol y el bisfenol A ejercen el efecto opuesto en *Chironomus riparius* (MARTINEZ-PAZ *ET AL.*, 2012). Se detectó una actividad de GST significativamente mayor en muestras de larvas de los ríos Sar y Louro (con mayor contenido y variedad de contaminantes) que en las del Con y del laboratorio; lo que indica que en las dos primeras se está produciendo una detoxificación activa más intensa.

En los insectos, se ha asociado un aumento de los niveles de GST con la resistencia a los insecticidas organoclorados y organofosforados

(VONTAS *ET AL.*, 2000); sin embargo la actividad de la GST en muestras del río Con, que presentó el mayor contenido de pesticidas en los sedimentos, no difirió estadísticamente de la obtenida en la población del laboratorio.

Las deformidades son importantes parámetros morfológicos que han sido ampliamente utilizados en los estudios de toxicidad, y han sido propuestos como biomarcadores para el biomonitorización de la contaminación. Aunque todavía se desconoce cómo los contaminantes pueden inducir deformidades de la parte bucal, se debate si se desarrollan o no en la etapa de muda regulada por el sistema endocrino y si una interrupción de este proceso es la causa de su aparición (MEREGALLI *ET AL.*, 2001).

Algunos compuestos tóxicos con actividad de alteración endocrina han sido descritos como inductores de deformidades de la parte bucal tales como 4-nonilfenol, DDT o metales pesados (MEREGALLI *ET AL.*, 2001; MARTÍNEZ *ET AL.*, 2003). Las deformidades en *Chironomus* representan una respuesta subletal a los contaminantes en los ecosistemas acuáticos y se consideran indicadores de alerta temprana para el deterioro de la calidad del agua (JANSSENS DE BISTHOVEN & GERHARDT, 2003). En nuestro estudio, las deformidades en el mentum, significativamente más frecuentes en las larvas del río Sar, son congruentes con los niveles de actividad enzimática de la GST ya expuestos y concuerdan con la alta prevalencia de deformidades previamente encontrados en la estación de muestreo del río Sar por SERVIA *ET AL.* (2000).

Se observó una disminución significativa en el contenido de glucógeno en larvas del río Con en comparación con el resto de las poblaciones

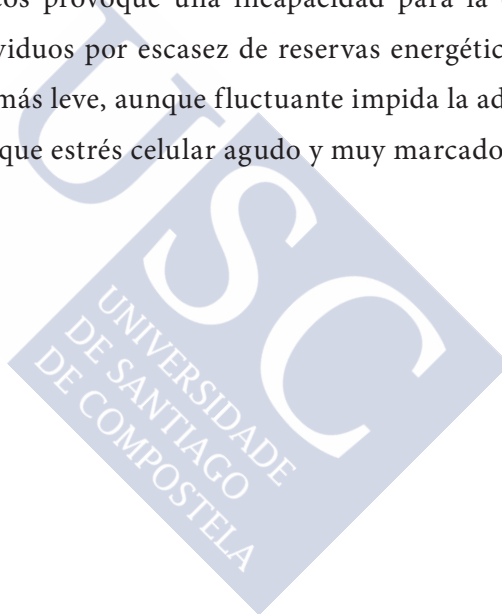
analizadas. Estos datos se correlacionan con el nivel de expresión más alto del gen *hsp70* en las larvas, así como con el menor contenido de materia orgánica en los sedimentos de ese río. Estos resultados están de acuerdo con el supuesto de que el estrés crónico provoca un costo energético y, por extensión, una disminución en el almacenamiento de glucógeno (BISCHOF, 1995; CHOI *ET AL.*, 2001). Sin embargo, las larvas de los ríos Sar y Louro, también expuestas a agentes estresantes químicos, no presentaron variaciones significativas en las reservas de glucógeno lo que sugiere que otros factores, como la disponibilidad de alimento, podrían compensar el gasto energético dedicado a contrarrestar los efectos de los tóxicos (STUIJFZAND *ET AL.*, 2000; SERVIA *ET AL.*, 2006).

Para MARYASKI *ET AL.* (2002) el estrés químico no siempre es compensado mediante detoxificación activa, aunque la mayoría de trabajos existentes así lo confirmen. En ese caso las reservas energéticas se mantienen constantes pero la esperanza de vida de los individuos cae drásticamente. Estos mismos autores proponen la hipótesis de la adaptación de las poblaciones sometidas permanentemente a algún tóxico puede tener como resultado una población tolerante al agente estresante soportado. Dicha población no mostraría disminuciones en sus niveles de reservas energéticas pero su *fitness* decrecería enormemente fuera de la zona de influencia del tóxico en cuestión.

De este modo, evaluando al situación conjuntamente se puede inferir que la población del río Sar, que es la más expuesta a contaminación química, tanto por concentración como por diversidad de especies y que muestra los efectos de esta en su mayor frecuencia de deformidades, es capaz de compensar la toxicidad mediante mecanismos de detoxificación sin

acusar estrés celular ni mermas en sus reservas energéticas; probablemente gracias al elevado aporte nutricional y a que el estrés sostenido y más o menos constante haya propiciado la actuación de la selección natural y la población se haya adaptado o aclimatado a las condiciones imperantes.

Lo mismo sucede en la población del Louro, aunque al ser el estrés químico más moderado no muestra un índice de deformidades tan elevado como la del Sar. En el extremo opuesto estaría la población del Con, la escasez de recursos tróficos provoque una incapacidad para la detoxificación activa de los individuos por escasez de reservas energéticas y en la que el estrés químico más leve, aunque fluctuante impida la adaptación de la población y provoque estrés celular agudo y muy marcado.



6.2. ESTUDIO ESTACIONAL

En el área de estudio de este trabajo, las condiciones fisicoquímicas (y por ende las bióticas) fluctúan estacionalmente según las características típicas del clima atlántico, con temperaturas más o menos suaves todo el año y un descenso de precipitaciones en los meses de verano. Esto se traduce, en el caso del río Sar, en una notable reducción del caudal y del oxígeno disuelto y un considerable aumento de la temperatura durante el verano (figura 30).

Las larvas de ambas especies muestran diferencias de peso medio estadísticamente significativas entre bimestres con valores más bajos en los meses de temperaturas altas -mínimos en julio-agosto- y más altos en los meses fríos -máximo en noviembre-diciembre en *C. riparius* y en enero-febrero en *P. olivacea* (figuras 30 y 31).

Los valores de concentración de glucógeno muestran la misma secuencia temporal: valores altos en los meses fríos -con valores mínimos con los meses de julio-agosto- y bajos en los cálidos. Sin embargo existen diferencias notables entre especies: *C. riparius* muestra niveles de glucógeno significativamente mayores entre noviembre y abril que en el resto del año y la amplitud entre máximo y mínimo es menor, mientras que en *P. olivacea* la concentración de glucógeno sólo destaca estadísticamente en marzo-abril y el rango de concentraciones es mayor.

En la gran mayoría de los metazoos el glucógeno es la principal reserva energética y constituye la fuente de energía de rápida movilización preferente, especialmente durante las fluctuaciones ambientales

(KARLSSON, 1979; HOFFMAN & KATZ, 1998; OLIVEIRA *ET AL.*, 2004; BACCA *ET AL.*, 2005).

SIEGERT *ET AL.* (1987), HAMBURGER *ET AL.* (1996), CAVALETTO *ET AL.* (2003) y SERVIA *ET AL.* (2006 B) coinciden en señalar la fase de desarrollo larvario en insectos como el factor de mayor relevancia en los niveles de glucógeno. En este experimento se trató de evitar esta variación debida al desarrollo ontogénico seleccionando únicamente larvas de estadio IV y fases V y VI según la clasificación de WÜLKER & GÖTZ (1968), ya que según SERVIA *ET AL.* (2006 B) es en esta etapa del desarrollo en la que los niveles de glucógeno alcanzan su máximo valor. En cuanto al sexo de los individuos SERVIA *ET AL.*, (OP. CIT.) no encontraron diferencias destacables entre individuos de *C. riparius* en la misma fase de desarrollo y distinto sexo.

Las altas temperaturas estivales junto con el alto contenido en materia orgánica provocan un descenso en la saturación de O₂ en verano (un 30% registrado en los muestreos, figura 29). Según HOBACK & STANLEY (2001) la hipoxia, asociada al incremento de temperatura y al descenso del caudal, suele tener dos consecuencias directas en los insectos que se ven sometidos a ella: la inducción del ayuno, y el paso del metabolismo aeróbico al anaeróbico, que es menos eficiente y que principalmente utiliza glucógeno como sustrato energético. Estos efectos de la hipoxia han sido corroborados en especies de quironómidos con carácter termófilo afines a *C. riparius* y *P. olivacea* por REDECKER & ZEBE (1988) y HAMBURGUER *ET AL.* (1994; 1995; 1996; 2000). De ser esta la causa y según lo demostrado por CHOI *ET AL.* (2001), la concentración de proteínas totales en *C. riparius* debería aumentar en condiciones

de hipoxia ya que en esta especie hasta un 60% del contenido total en proteínas bajo condiciones de hipoxia corresponde a la hemoglobina (WEBER *ET AL.*, 1985; CHOI, 1998).

Sin embargo, en la concentración de proteínas totales sólo se hallaron diferencias significativas entre bimestres para *C. riparius* (figura 35) y los valores más bajos se obtuvieron precisamente de mayo a agosto, los meses de temperaturas más alta y mayor estiaje, lo que descarta la hipótesis de que la hipoxia sea la causa de la baja concentración de glucógeno en los meses cálidos.

Se ha demostrado que en *C. riparius* la contaminación química acarrea una disminución en las reservas de glucógeno (CHOI, 1998; CHOI *ET AL.*, 2001; SERVIA *ET AL.*, 2006 A) y de proteínas (CHOI & HA, 2009; CHOI *ET AL.*, 2001). Cabría esperar un mayor estrés por contaminación química en los meses de mayor estiaje por concentración de los contaminantes, sin embargo en el trabajo sobre análisis de deformidades realizado por SERVIA *ET AL.* (1999) en la misma estación de muestreo y con las mismas especies, los resultados obtenidos determinaron un mayor efecto de los contaminantes en los meses más fríos, por consiguiente la contaminación química tampoco es una causa clara de las diferencias estacionales halladas en la concentración de glucógeno y proteínas.

De acuerdo con la afirmación de DUTRA *ET AL.* (2008), de que los niveles de reservas energéticas son una expresión de las características y estrategias adaptativas de los animales a un determinado hábitat, los ciclos vitales y con ellos los niveles de reservas energéticas, suelen estar sincronizados con estas variaciones de las condiciones ambientales (GALAP *ET AL.*, 1997; VINAGRE *ET AL.*, 2007; DUTRA *ET AL.*, 2007; 2008).

En el caso de los quironómidos objeto de este estudio, es en los meses de primavera y verano cuando tiene lugar la reproducción, dando lugar a un aumento en la densidad de larvas en la zona, lo que incrementa la competencia intra e interespecífica entre ambas especies y consecuentemente disminuye la cantidad de alimento potencial. Factores que según FUENTES *ET AL.* (2005), en el caso de la competencia, y CAVALETTO *ET AL.* (2003) en el de la disponibilidad de alimento, tienen efectos negativos en las reservas de glucógeno.

GISMONDI *ET AL.* (2012) afirman que las reservas de energía en el anfípodo de agua dulce *Gammarus roeseli* están notablemente influenciadas por la estación. Encontraron altas niveles de reservas energéticas en otoño e invierno y bajos en primavera y verano, lo que sugiere que el bajo metabolismo debido a las bajas temperaturas puede explicar la reducción del gasto energético y altos niveles de reservas en estaciones frías.

Los efectos de la temperatura y el fotoperiodo durante la duración de los ciclos de vida de quironómidos son bien conocidos. La temperatura es proporcional en la velocidad de desarrollo y los periodos reducidos de luz natural son un fuerte estímulo para el inicio de la diapausa en insectos (KOŠTÁL, 2006) y más específicamente en larvas de *Chironomus riparius* de 3º y 4º estadios (GODDEERIS *ET AL.*, 2001). Entonces muchos individuos de estas especies entran en un estado de diapausa durante los meses más fríos, de manera que alargan sus últimas fases larvarias hasta que suben de nuevo las temperaturas. Así, las generaciones de los meses fríos pasan mucho más tiempo en estadio IV, lo que supone una mayor ingesta, mayor tamaño corporal y unas mayores reservas

de glucógeno (WIPKING *ET AL.*, 1995; TIMMERMAN & BRIEGEL, 1999; GODDEERIS *ET AL.*, 2001), y probablemente también esto afecte a la concentración de proteínas.

En este caso y siendo ambas especies multivoltinas en lugar de ciclos reproductivos hablamos de ciclos vitales o generaciones. Estos ciclos son más cortos en ambas especies en los meses cálidos, tal y como apunta TOKESHI (en ARMITAGE *ET AL.*, 1995)

Las fluctuaciones estacionales de los niveles de proteínas en los animales también suelen estar íntimamente relacionadas con los ciclos reproductivos de los mismos (GALAP *ET AL.*, 1997; CHOE *ET AL.*, 2003 ;ROSA & NUNES 2003; DUTRA *ET AL.*, 2007; 2008; SILVA-CASTIGLIONI *ET AL.*, 2007).

Además, según HAMBURGER *ET AL.* (1996) durante la época de temperaturas más elevadas, el ciclo vital de *Chironomus anthracinus* es más corto y las reservas de glucógeno sólo alcanzan los valores requeridos para un correcto desarrollo de las fases de pupa e imago. Concomitantemente, muchos individuos de estas especies entran en un estado de diapausa durante los meses más fríos, de manera que alargan su última fase larvarias hasta que suben de nuevo las temperaturas. Así, las generaciones de los meses fríos pasan mucho más tiempo en estadio IV, lo que supone una mayor ingesta, mayor tamaño corporal y unas mayores reservas de glucógeno (WIPKING *ET AL.*, 1995; TIMMERMAN & BRIEGEL, 1999; GODDEERIS *ET AL.*, 2001; KOŠTÁL, 2006).

Las diferencias entre las dos especies pondrían de manifiesto el carácter más termófilo de *C. riparius*, ya que las larvas comienzan a ralentizar su desarrollo y a entrar en diapausa unos dos meses antes que las de

P. olivacea.

En lo tocante a los resultados de cuantificación de proteínas totales, cabe señalar que se corresponden con los obtenidos por VAN HANDEL (1988) en los géneros *Aedes* y *Culex* (30-400 µg/ larva) y que este caso debido a la ausencia de trabajos al respecto no podemos afirmar si se puede obviar el sexo como ocurre con el glucógeno (SERVIA ET AL., 2006 B) o tiene relativa importancia sobre los niveles de estas macromoléculas. En cuanto a la fase de desarrollo, tampoco hemos encontrado trabajos relacionados con los niveles de proteínas y el desarrollo larvario, pero en este caso el posible sesgo ha sido minimizado al pertenecer todas las larvas a las fases 4, 5, 6 o 7 del estadio IV según la clasificación de WÜLKER & GÖTZ (1968).

DNA es un factor biológico estable porque sus valores cuantitativos se mantienen más o menos constantes mientras que la concentración de RNA, directamente relacionada con la síntesis activa de proteínas, puede variar en función de múltiples factores: la edad, el estado de desarrollo, el tamaño del organismo, el estado nutricional y las condiciones ambientales, por ejemplo; y por ello, la relación RNA/DNA refleja variaciones coherentes con ellos (LODEIROS ET AL., 1996; OKUMURA ET AL., 2002; ROSA & NUNES, 2003; CHÍCHARO & CHÍCHARO, 2008).

En lo referente a los valores de la relación RNA/DNA, que concuerdan con los obtenidos en otros artrópodos dulceacuícolas (VREDE ET AL., 2002), sólo en *P. olivacea* se observa una tendencia significativa, negativa de invierno a verano y positiva desde verano y durante el otoño.

La causa principal para estas diferencias estacionales podría ser en mayor estrés químico detectado en invierno y en la misma área de estudio por

SERVIA *ET AL.* (1999). Ya que según FIGUEROA *ET AL.* (1996), en ciertos casos de contaminación, la síntesis de proteínas de detoxificación, puede provocar incrementos en la relación RNA/DNA. Esto se vería acentuado por la mayor duración de los ciclos vitales en esta estación y mayor tiempo de exposición a los tóxicos (WIPKING *ET AL.*, 1995; TIMMERMAN & BRIEGEL, 1999; GODDEERIS *ET AL.*, 2001; KOŠTÁL, 2006).

Por otro lado la relación RNA/DNA en *C. riparius* también desciende desde invierno a verano aunque no de modo estadísticamente significativo. Esto podría ser debido a que la producción de hemoglobina, como respuesta al descenso en la concentración de oxígeno (CHOI, 1998), aunque no es suficientemente intensa en esos meses como para enmascarar las diferencias en la concentración de proteínas, sí atenúa la reducción de la relación RNA/DNA.

6.3. ESTUDIO ONTOGÉNICO

Se ha estudiado con bastante profundidad el papel del glucógeno en el desarrollo larvario de insectos. Durante los periodos de muda y metamorfosis, los animales ayunan y consumen energía procedente de las reservas asimiladas durante el periodo de alimentación previo, tal y como han demostrado por SIEGERT *ET AL.* (1987) en el lepidóptero *Manduca sexta*, CAVALETTO *ET AL.* (2003) en efemerópteros del género *Hexagenia* y por VAN HANDEL (1988) en especies de los géneros de dípteros *Culex* y *Aedes*.

De hecho, HAMBURGER *ET AL.* (1996) categorizan los niveles de glucógeno como factor clave para los periodos de muda y metamorfosis en *Chironomus anthracinus* y afirman que los cambios posteriores a la pupación suponen una gran demanda de glucógeno, imprescindible para que el proceso de emergencia tenga lugar. Estos autores detectaron niveles similares a los previos a la muda de tercer a cuarto estadio (un 26-28% del peso seco) justo antes de la pupación, durante la cual la concentración de glucógeno se aproximó al 22% en pupas jóvenes y disminuyó durante la etapa pupal hasta el 12-15% en los adultos recién emergidos.

SERVIA *ET AL.* (2006 B) encontraron diferencias entre fases y por sexos de las reservas de glucógeno en larvas de *C. riparius* procedentes de un cultivo. Los niveles de glucógeno en ambos sexos siguen un patrón similar al obtenido por nosotros. Se confirma así la hipótesis de que las larvas de ambas especies aumentan su almacenamiento de energía a lo largo del cuarto estadio hasta la pupación.

Los rangos de valores de contenido de glucógeno y peso promedio de ambas especies estudiadas obtenidos este trabajo son similares a los de las publicaciones previas de CHOI *ET AL.* (2001) y SERVIA *ET AL.* (2006 A) y siguen el curso temporal ontogénico descrito en cultivos de laboratorio de *C. riparius* por INEICHEN *ET AL.* (1979) y SERVIA *ET AL.* (2006 A Y 2006 B).

Las larvas de ambas especies mostraron diferencias estadísticamente significativas en el peso medio por larva y la concentración de glucógeno. La tendencia fue la misma en todos los casos: un incremento más o menos pronunciado de los dos parámetros a lo largo del cuarto estadio hasta alcanzar valores máximos al comienzo de la fase de prepupa decayendo en la etapa de pupa (figuras 41, 42, 43 y 44). Teniendo en cuenta que todas las larvas fueron recogidas y tratadas en el mismo momento y en idénticas condiciones, podemos suponer que las diferencias observadas están directamente relacionadas con la fase de desarrollo

La cantidad de proteínas totales de un individuo, aparte de proporcionar una medida de su crecimiento a largo plazo, es también un indicador del almacenamiento de energía (VILLARROEL *ET AL.*, 2009). Haciendo abstracción de sus fluctuaciones debidas a factores naturales (DEPLEDGE & FOSSI, 1994; LAGADIC *ET AL.*, 1997; CHOI, 1998), los estudios realizados en diferentes organismos, especialmente peces y artrópodos, muestran un incremento más o menos lineal de la cantidad de proteínas durante el desarrollo, hasta llegar a las fases previas a la metamorfosis, en las que se produce un aumento más pronunciado, descendiendo drásticamente en la etapa postmetamórfica (VAN HANDEL, 1988; TIMMERMAN & BRIEGEL, 1999; GWAK & TANAKA, 2002).

En general, en los individuos analizados por nosotros se reproduce el fenómeno, repetidamente descrito en la bibliografía de la reducción del ritmo de crecimiento en longitud en el momento de la metamorfosis. Los niveles de proteínas totales muestran diferencias estadísticamente significativas entre algunas clases de desarrollo en *C. riparius* pero no en *P. olivacea* (figura 45). La concentración de proteínas en *C. riparius* aumenta a lo largo del cuarto estadio de forma similar, aunque menos pronunciada, a la concentración de glucógeno, pero al contrario que ésta, aquella no decae en la fase de pupa. Esta tendencia está en concordancia con los resultados obtenidos en algunas larvas de peces antes de la metamorfosis (TONG *ET AL.*, 2010; SMITH & OTTEMA, 2006). Puede decirse por tanto, que existe una relación positiva entre la concentración de proteínas y el grado de desarrollo ontogénico a lo largo del cuarto estadio de las larvas de *C. riparius*.

La relación RNA/DNA ha sido usada para predecir el crecimiento y el estado nutricional en gran variedad de organismos como bacterias (KENNELL & MGASANIK 1962), fitoplancton (DORTCH *ET AL.*, 1983), zooplancton (SUTCLIFFE, 1965; WAGNER *ET AL.*, 1998), bentos marino (VIDAL *ET AL.*, 2006; MEESTERS *ET AL.*, 2002; WRIGHT & MARTIN, 1985), bentos dulceacuícola (MEWES & WINKELMANN, 2015), insectos (CHURCH & ROBERTSON, 1966), peces (BULOW, 1970; BUCKLEY, 1984; CLEMMESSEN *ET AL.*, 2003; ISLAM & TANAKA, 2005; MERCALDO- ALLEN *ET AL.*, 2006), reptiles (ROARK *ET AL.*, 2009) y humanos (ELSER *ET AL.*, 2007). De hecho, fue propuesta como una medida muy sensible a corto plazo (días o semanas) de la tasa de crecimiento (BUCKLEY, 1984; ROOKER & HOLT, 1996; CLEMMENSSEN, 1996; BUCKLEY *ET AL.*, 1999; FUKUDA *ET AL.*, 2001; GWAK & TANAKA, 2001; MENDOZA *ET AL.*, 2002; MERCALDO-ALLEN *ET*

AL., 2006; TAVARES *ET AL.*, 2006).

Sin embargo, a pesar de su uso generalizado, la bibliografía consultada muestra situaciones contradictorias, pues algunos de esos trabajos señalan relaciones positivas de la relación RNA/DNA con el tamaño de los individuos (GARCÍA *ET AL.*, 1998; RAMÍREZ *ET AL.*, 2001), mientras que otros no han encontrado ninguna correlación con el crecimiento (RAMÍREZ *ET AL.*, 2004; CATALÁN *ET AL.*, 2006) o estas correlaciones son muy débiles (DAGG & LITTLEPAGE, 1972; CLARKE *ET AL.*, 1989; ANGER & HIRCHE, 1990; FRANTZIS *ET AL.*, 1992), o indican una tendencia a la disminución de la relación RNA/DNA con respecto a la talla de los individuos relacionada con condiciones de alimentación deficientes y en etapas de rápido desarrollo larvario y de organización del tejidos (CLEMMESSEN *ET AL.*, 1987; RAAE *ET AL.*, 1988; WESTERMAN & HOLT 1988; BERGERON *ET AL.*, 1991; TAVARES *ET AL.*, 2006).

SATTERWHITE (2007) indica que frecuentemente los descensos observados en la relación RNA/DNA no son causados por la hipótesis inicial de cantidades de DNA constantes junto con la disminución del RNA, como se ha afirmado en la mayoría de estudios de este tipo, sino que ambos ácidos nucleicos pueden exhibir patrones simultáneos de cambio, y en fases de crecimiento y buena alimentación es posible una disminución de la relación RNA/DNA, porque se produzca un aumento simultáneo de las cantidades de RNA y DNA, de manera que las magnitudes de la ratio no siempre son el resultado de las diferencias en el estado de condición, como se esperaba, sino que están estrechamente ligadas a los cambios celulares en el contenido de ambos ácidos nucleicos durante el desarrollo. Así pues, SATTERWHITE (2007) apunta la posibilidad de que los casos de

relación inversa entre la relación RNA/DNA y el crecimiento se expliquen considerando las observaciones de varios autores como LIED *ET AL.* (1983), FOSTER *ET AL.* (1991) y FOSTER *ET AL.* (1992), quienes demostraron que la síntesis de proteínas no es un resultado solamente del número de ribosomas (es decir, del contenido de RNA), sino también de su actividad específica, y tanto el número como la actividad de los ribosomas pueden cambiar independientemente. Además, varios estudios sugieren que puede existir un desacoplamiento de la concentración de RNA y la síntesis de proteínas debido a la dinámica de la proliferación celular (hiperplasia) o el crecimiento de las células (hipertrofia) en larvas de peces (WESTERMAN & HOLT, 1988; MATHERS *ET AL.*, 1993; PELLETIER *ET AL.*, 1995; GWAK & TANAKA, 2002).

GOROKHOVA & KYLE (2002), trabajando con juveniles de *Daphnia magna* en condiciones experimentales constantes, hallaron variaciones significativas en sus concentraciones de DNA y RNA durante su desarrollo ontogénico. Durante el desarrollo embrionario la concentración de ambos ácidos nucleicos aumentó, pero al hacerlo en mayor medida el DNA, debido a la alta tasa de división celular, se produjo un descenso de la relación RNA/DNA. En la etapa juvenil la concentración de ambos ácidos nucleicos descendió mientras que la relación RNA/DNA aumentó de forma significativa y lineal. Los autores explican esta tendencia con los procesos de crecimiento celular y el aumento de la proporción de tejido acelular.

En una primera aproximación a nuestros datos la relación RNA/DNA no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las distintas fases del desarrollo del 4º estadio de larvas de *P. Olivacea*, al contrario

que *C. riparius* en las que la relación RNA/DNA sigue una tendencia creciente a lo largo del 4º estadio pero sufre un brusco descenso a partir de la fase VII, evolución que concuerda con la tendencia observada en otros organismos con desarrollo indirecto (MENDOZA ET AL., 2002; GWAK & TANAKA, 2002; IBIAM & GRANT, 2005). El incremento de la relación RNA/DNA refleja un incremento en la síntesis de proteínas estructurales y reguladoras, correspondiente a una fase de crecimiento e hipertrofia celular, ya que la concentración de DNA permanece constante mientras que la de RNA aumenta hasta el máximo cerca de la pupación.

El brusco descenso de la relación RNA/DNA en las fases de pupa y prepupa es debido tanto al descenso de la concentración de RNA como el notable aumento de la concentración de DNA, que indica un descenso en la síntesis proteica y un incremento de la división celular o hiperplasia, proceso propio de la fase de metamorfosis en la que cesa el crecimiento celular o hipertrofia y da paso a procesos de reordenación tisular y organogénesis. En todo caso, la variabilidad observada entre especies parece reflejar que el patrón de la variación ontogénica de este parámetro es muy susceptible de ser modificado por múltiples factores.

En líneas generales podemos concluir que las larvas de ambas especies aumentan su almacenamiento de energía a lo largo del cuarto estadio hasta la pupación, ya que necesitan esta energía para llevar a cabo la metamorfosis y cumplir con los requisitos de la etapa adulta.







CONCLUSIONES



1. En larvas de *C. riparius* procedentes de poblaciones silvestres con diferentes cargas contaminantes el gen HSC70 parece ser relativamente estable, mientras que el HSP70 se sobreexpresa en todos los casos aunque no proporcionalmente a la carga contaminante, sino que lo hace, aparentemente, con mayor intensidad en los casos en los que el estrés es crónico.
2. La actividad enzimática de la GST parece ser un buen indicador detoxificación activa en larvas de *C. riparius* en poblaciones silvestres con mezclas complejas de contaminantes, aunque no parece mostrar respuesta diferencial ante la presencia de pesticidas en los sedimentos.
3. La concentración de glucógeno en larvas de *C. riparius* procedentes de poblaciones silvestres podría ser un buen indicador de estado metabólico y estrés genérico, ya que integra las distintas presiones y muestra descensos sólo en los casos en los que el estrés no puede ser compensado, bien por adaptación de la población, bien por abundancia de recursos nutricionales.
4. Se confirma la validez de la frecuencia de deformidades en el mentum de larvas de *C. riparius* como indicador de estrés tóxico en poblaciones silvestres expuestas a mezclas complejas de contaminantes.
5. Queda patente el efecto compensatorio de la abundancia de recursos tróficos frente a agentes estresantes en larvas de *C. riparius* de poblaciones silvestres.
6. El peso medio por larva y la concentración de glucógeno en larvas de *C. riparius* y de *P. olivacea* varían significativamente a lo largo del año, principalmente en función de las condiciones ambientales y del ciclo vital de las especies. Las diferencias entre las dos especies pondrían de manifiesto el carácter más termófilo de *C. riparius*, ya que las larvas comienzan a ralentizar su desarrollo y a entrar en diapausa unos dos meses antes que las de *P. olivacea*.

7. Se observó un descenso estival significativo en la concentración de proteínas totales en la especie *C. riparius* y de la relación RNA/DNA en *P. olivacea*, cuya causa podría ser el mayor estrés químico y estar acentuado por la mayor duración de los ciclos vitales en esta estación y mayor tiempo de exposición a los tóxicos.

8. El presumible incremento de la síntesis de hemoglobina en los meses cálidos produce efectos de enmascaramiento sobre la concentración de proteínas totales en *C. riparius*.

9. En general, existe una reducción de todos los parámetros analizados en verano, debida probablemente a la menor duración de los ciclos vitales y al menor estrés químico en esta época.

10. Es necesario el esclarecimiento de las causas del fuerte aumento otoñal obtenido en la relación RNA/DNA en *C. riparius*. Sería conveniente por este motivo un nuevo análisis de este parámetro con un mayor tamaño muestral y sexado previo de las larvas.

11. A tenor de ciertos problemas en la interpretación de los resultados obtenidos, es recomendable la realización de un estudio previo acerca de la influencia del sexo sobre la concentración de proteínas totales y la relación RNA/DNA, o al menos el sexado de las larvas, a la hora de emplear estos parámetros como indicadores metabólicos en *C. riparius* y *P. olivacea*.

12. Para el correcto uso de la relación RNA/DNA como herramienta en la determinación de estrés ambiental y con el fin prevenir un posible sesgo en los resultados, se recomienda el análisis de las variaciones circadianas de este indicador en las especies estudiadas. Como alternativa deberían tomarse las distintas muestras a comparar exactamente a la misma hora, ya que no está claro cómo influye este factor en *C. riparius* y *P. olivacea*.

13. Para el correcto uso de los niveles de glucógeno y proteínas así como de la relación RNA/DNA como indicadores metabólicos en poblaciones y comunidades naturales, se hace imprescindible la consideración de los resultados obtenidos en este trabajo. Por este motivo es recomendable la distribución temporal de la recogida de muestras en invierno o primavera o, en su defecto, a lo largo de todo el año realizando un promedio de los valores obtenidos, y una suma precaución en la interpretación de los resultados.

14. Asimismo, es factible la combinación de ambas especies utilizando diferentes indicadores, de tal forma que se tomen los que menor variación estacional sufran en cada una de ellas: glucógeno en *P. olivacea* y proteínas y relación RNA/DNA en *C. riparius*







BIBLIOGRAFÍA



-A-

- ABOU-SEIF, M. A. M., MAIER, V., FUCHS, J., MEZGER, M., PFEIFFER, E. F. & BOUNIAS, M. (1993). Fluctuations of carbohydrates in Haemolymph of Honeybee (*Apis mellifica*) after fasting, feeding and stress. - *Horm. metab. Res.*, 25, 4-8.
- ACOSTA, V. & LODEIROS, C. (2003). Índice RNA/DNA en poblaciones de la almeja *Tivela mactroides* (Bivalvia: Venereidae) provenientes de localidades con diferentes niveles de contaminación. - *Revista científica FCV-LUZ*, 13, 5, 378-382.
- AISEMBERG, J., NAHABEDIAN, D. E., WIDER, E. A., GUERRERO & A. N. R. V. (2005). Comparative study on two freshwater invertebrates for monitoring environmental lead exposure. - *Toxicology*, 210, 45-53.
- ALAIMO, J., OGLE, R. S. & KNIGHT, A. W. (1994). Selenium uptake by larval *Chironomus decorus* from a *Ruppia maritima*-based benthic/detrital substrate. - *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 27, 441-448.
- ALBU, P. (1980): Fauna republicii socialiste România. Insecta. Diptera. Fam. Chironomidae-Subfam. Chironominae. Editura Academiei republicii socialiste România, Bucarest. 320 pp.
- AMARAL, V., PENHA-LOPES, G. & PAULA, J. (2009). RNA/DNA ratio of crabs as an indicator of mangrove habitat quality. - *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.*, 19, 56-62.
- AMIARD, J. C. (1994). Surveillance de la qualité des milieux aquatiques par les biomarqueurs. - *Irepolia, La Chronique*, 9, 2
- AMIARD, J.C., & AMIARD-TRIQUET, C. (1980). Le transfert des polluants radioactifs dans les chaînes alimentaires aquatiques. - *Année Biol.*, 19, 117-146.
- AMIARD, J.C., AMIARD-TRIQUET, C., BARKA, S., PELLERIN, J., & RAINBOW, P.S (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. - *Aquat. Toxicol.*, 76, 160-202.
- ANDERSON, R. L. (1980). Chironomidae toxicity tests - Biological background and procedures. - En: Buikema, A. L. Jr. & Cairns, J. (Eds.). *Aquatic Invertebrate Bioassays*, ASTM STP 715. American Society for Testing and Materials. pp. 70-80.
- ANDERSON, R. L., WALBRIDGE, C. T. & FIANDT, J. T. (1980). Survival and

growth of *Tanytarsus dissimilis* (Chironomidae) exposed to copper, cadmium, zinc, and lead. - Arch. Environm. Contam. Toxicol., 9, 329-335.

ANGER, K. & HIRCHE, H.J. (1990). Nucleic acids and growth of larval and early juvenile spider crab, *Hyas araneus*. - Marine Biology, 105, 403-411.

ANSALDO, M., NAHABEDIAN, D. E., HOLMES-BROWN, E., AGOTE, M., ANSAY, C. V., GUERRERO, N. R. V., & WIDER, E. A. (2006). Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. - Toxicology, 224, 119-127.

ARMITAGE, P., CRANSTON, P. S. & PINDER, L. C. V. (1995): The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges. - Chapman & Hall, London. 572 pp.

ASTM (2010) ASTM E1706 *Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment- Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates*. ASTM International, West Conshohocken.

ASTON, W. A. (1998): *Morphological deformities in chironomid larvae (Chironomidae: Diptera): Biomarkers of urban pollutyed sediments*. - Tesis doctoral. Staffordshire University, Inglaterra. 245 pp

-B-

BACCA, H., HUVET, A., FABIUX, C., DANIEL, J. Y., DELAPORTE, M., POUVREAU, S., VAN WORMHOUDT, A. & MOAL, J. (2005). Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. - Comparative Biochemistry and Physiology, 140B, 635-646.

BARCA, S. M. (2015). Biomarcadores metabólicos y de reserva energética en *lamprea marina* (*Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758). Tesis doctoral. Universidade de Santiago de compostela.

BARCA, S. M., SERVIA, M. J., COBO, F., & GONZALEZ, M. A. (2008). The effect of human use of sandy beaches on developmental stability of *Talitrus saltator* (Montagu, 1808)(Crustacea, Amphipoda). A study on fluctuating asymmetry. - Marine Ecology, 29, 91-98.

BAUDIN, J. P. & NUCHO, R. (1992). ⁶⁰Co accumulation from sediment and planktonic algae by midge larvae (*Chironomus luridus*). - Environ. Pollut., 76.133-140.

- BARATA, C. & BAIRD, D. J. (2000). Determining the ecotoxicological mode of action of chemicals from measurements made on individuals: results from instar-based tests with *Daphnia magna* Straus. - *Aquat. Toxicol.*, 48, 195-209.
- BARUTO, W., LAGADIC, L. & CAQUET, T. (1995). Growth, fecundity and glycogen utilization in *Lymnaea palustris* exposed to antrazine and hexachlorobenzene in freshwater mesocosms. - *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 503-511.
- BAZERQUE, M. F., LAVILLE, H. & BROUQUET, Y. (1989). Biological quality assessment in two rivers of the northern plain of France (Picardie) with special reference to chironomid and diatom indices. - *Acta Biol. Debr. Oecol. Hung.*, 3, 29-39.
- BAZZANTI, M. & BAMBACIGNO, F. (1987). Chironomids as water quality indicators in the river Mignone (Central Italy). - *Hydrobiol. Bull.*, 21 (2), 213-222.
- BECKER, C., BREPOHL, D., FEUCHTMAYR, H., ZÖLLNER, E., SOMMER, F., CLEMMESSEN, C., SOMMER, U., & BOERSMA, M. (2005). Impacts of copepods on marine seston, and resulting effects on *Calanus finmarchicus* RNA:DNA ratios in mesocosm experiments. - *Marine Biology*, 146, 531-541.
- BENDELL-YOUNG, L., CHOUNARD, J. & PICK, F. R. (1994). Metal concentrations in chironomids in ratio to peatland geochemistry. - *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 27, 186-194.
- BENOIT, D. A., SIBLEY, P. K., JUENEMANN, J. L. & ANKLEY, G. T. (1997). *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments. - *Environ. Toxicol. Chem.*, 16 (6), 1165-1176.
- BERDALET, E., ROLDÁN, C. & OLIVAR, M. P. (2005 B). Quantifying RNA and DNA in planktonic organisms with SYBR Green II and nucleases. Part B. Quantification in natural samples. *Scientia Marina*, 69 (1): 17-30.
- BERDALET, E., ROLDÁN, C., OLIVAR, M. P. & LYSNES, K. (2005 A). Quantifying RNA and DNA in planktonic organisms with SYBR Green II and nucleases. Part A. Optimisation of the assay. *Scientia Marina*, 69 (1): 1-16

- BERG, M. B. (1995). Larval food and feeding behaviour. - *En* Armitage, P., Cranston, P. S. & Pinder, L. C. V. (Eds.). *The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges*. Chapman & Hall, London. pp. 136-168.
- BERGERON, J-P., BOULHIC, M. & GALOIS, R. (1991). Effet de la privation de nourriture sur la teneur en ADN de la larve de sole (*Solea solea* L.). - *ICES Journal of Marine Science*, 48: 127-134.
- BERVOETS, L., INT PAINS, L. & VERHEYEN, R. (1994). Trace metal levels in water, sediments and *Chironomus gr. thummi*, from different water courses in Flanders (Belgium). - *Chemosphere*, 29, 1591-1601.
- BINELLI, A., RICCIARDI, F., RIVA, C. & PROVINI, A. (2005). Screening of POP pollution by AChE and EROD activities in Zebra mussels from the Italian Great Lakes. - *Chemosphere*, 61, 1074-1082.
- BINELLI, A., RICCIARDI, F., RIVA, C. & PROVINI, A. (2006). New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). - *Chemosphere*, 62, 510-519.
- BIRD, G. A., ROSENTERETER, M. J. & SCHWARTZ, W. J. (1995): Deformities in the menta of chironomid larvae from the Experimental Lakes Area, Ontario. - *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 2290-2295.
- BISCHOF, C. (1995). Effects of heavy metal stress on carbohydrate and lipid concentrations in the haemolymph and total body tissue of parasitized *Lymantria dispar* L. larvae (Lymantriidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 112C, 87-92.-
- BOARD, P. G., & MENON, D. (2013). Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. - *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3267-3288.
- BOLT, H.M. & ROS, P.H. (2008) Generation of reactive intermediates by cytochromes P450. *En* *Cytochromes P450. Role in the Metabolism and Toxicity of Drugs and Other Xenobiotics. Issues in Toxicology* (C. Ioannides ed.), 46-94. RSC Publishing, Cambridge.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. - *Anal.Biochem.*, 72, 248-254.

- BRATTSTEN, L. B. (1989). Insecticide resistance: Research and management. - *Pesticide Science*, 26(4), 329-332.
- BRIEGEL, H. (2003). Physiological bases of mosquito ecology. - *J. Vector. Ecol.*, 28, 1-11.
- BROCK, E. M. (1960). Mutualism between the midge *Cricotopus* and the alga *Nostoc*. - *Ecology*, 41, 474-483.
- BROWNING, C., MARTIN, E., LOCH, C., WURTZ, J. M., MORAS, D., STOTE, R.H. (2007) Critical role of desolvation in the binding of 20-hydroxyecdysone to the ecdysone receptor. - *J. Biol. Chem.*, 282, 32924-34
- BUCKLEY, L. J. (1979). Relationships between RNA-DNA ratio, prey density, and growth rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. - *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 36, 1497-1502.
- BUCKLEY, L. J. (1984). RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. - *Marine Biology*, 80, 291-298.
- BUCKLEY, L. J., CALDARONE, E. & ONG, T. L. (1999). RNA-DNA ratio and other nucleic acid-based indicators for growth and condition in marine fishes. - *Hydrobiologia*, 401, 265-277.
- BULOW, F. J. (1970). RNA-DNA ratios as indicators of recent growth rates of a fish. - *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 27, 2343-2349.
- BULOW, F. J. (1987). RNA:DNA ratios as indicators of growth in fish: a review. *En. Summerfelt, R. C., Hall, G. E. (eds.) Age and growth of fish*. Iowa State University Press, Ames, p. 45-64.
- BURSELL, E. (1970). *An introduction to insect physiology*. Academic Pr. London.

-C-

- CAIRNS, J. JR. & PRATT, J. R. (1993). A history of biological monitoring using benthic macroinvertebrates. - *En Rosenberg, D. M. & Resh, V. H. (Eds.). Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*. Chapman & Hall, London. pp. 10-27.
- CALDARONE, E. M. & BUCKLEY, L. J. (1991). Quantitation of DNA and RNA in crude tissue extracts by flow injection analysis. - *Analytical Biochemistry*, 199: 137-141.

- CALDARONE, E. M., CLEMMESSEN, C. M., BERDALET, E., MILLER, T. J., FOLKVORD, A., HOLT, G. J., OLIVAR, M. P. & SUTHERS, I. M. (2006). Intercalibration of four spectrofluorometric protocols for measuring RNA/DNA ratios in larval and juvenile fish. - *Limnology and Oceanography: Methods*, 4: 153-163.
- CALLAGHAN, A., PARKER, P. J. A. N. & HOLLOWAY, G. J. (1998). The use of variance in enzyme activity as an indicator of long-term exposure to toxicant-stressed environments in *Culex pipiens* mosquitoes. - *Funct. Ecol.*, 12, 436-441.
- CANFIELD, T. J., BRUNSON, E. L., DWYER, F. J., INGERSOLL, C. G. & KEMBLE, N. E. (1998): Assessing sediments from Upper Mississippi River navigational pools using a benthic invertebrate community evaluation and the sediment quality triad approach. - *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 35: 202-212
- CANINO, M. F. & CALDARONE, E. M. (1995). Modification and comparison of two fluorometric techniques for determining nucleic acid contents of fish larvae. - *Fishery Bulletin*, 93: 158-165.
- CARBALLEIRA, A., DEVESA, C., RETUERTO, R., SANTILLÁN, E. & UCIEDA, F. (1983). *Bioclimatología de Galicia*. - Edición Fundación Barrié de la Maza, A Coruña. 250 pp.
- CASAS, J., DRIESSEN, G., MANDON, N., WIELAARD, S., DESOUHAN, E., VAN ALPHEN, J., LAPCHIN, L., RIVERO, A., CHRISTIDES, J. P., & BERNSTEIN, C. (2003). Energy dynamics in a parasitoid foraging in the wild. - *J Anim. Ecol.*, 72, 691-697.
- CATALÁN, I. A., OLIVAR, M. P., PALOMERA, I. & BERDALET, E. (2006). Link between environmental anomalies, growth and condition of pilchard *Sardina pilchardus* larvae in the northwestern Mediterranean. - *Marine Ecology Progress Series*, 307, 219-231
- CATOIRA, J. L. & MÍGUEZ, L. J. (1999): Effects of oil pollution on skeleton and tissues of *Echinus esculentus* L., 1758 (Echinodermata, Echinoidea) in a population of A Coruña Bay, Galicia, Spain. - *En Candia Carnevali, M. D. & Bonasoro, F. (Eds.). Echinoderm Research 1998*. Balkema, Rotterdam. pp. 439-447
- CAVALETTO, J. F., NALEPA, T. F., FANSLow, D. L., & SCHLOESSER, D. W. (2003). Temporal variation of energy reserves in mayfly nymphs (*Hexagenia spp.*) from Lake St Clair and western Lake Erie. - *Freshwater Biol.*, 48, 1726-1738.

- CHE-MENDOZA, A., PENILLA, R. P., & RODRÍGUEZ, D. A. (2009). Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: a review. - *African Journal of Biotechnology*, 8(8).
- CHÍCHARO, L. M. Z. & CHÍCHARO, M. A. A. T. (1995). The DNA/RNA ratio as a useful indicator of the nutritional condition in juveniles of *Ruditapes decussatus*. - *Sci. Mar.*, 59, 95-101.
- CHÍCHARO, L. M. Z., CHÍCHARO, M. A., ALVES, F., AMARAL, A., PEREIRA, A., REGALA, J. (2001). Diel variation of the RNA/DNA ratios in *Crassostrea angulata* (Lamarck) and *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1758) (Mollusca: Bivalvia). - *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 259, 121-129.
- CHÍCHARO, M. A. & CHÍCHARO, L. (2008). RNA:DNA ratio and other nucleic acid derived indices in marine ecology. - *Int. J. Mol. Sci.*, 9, 1453-1471.
- CHOE, N., DEIBEL, D., THOMPSON, R. J., LEE, S. H. & BUSHHELL, V. K. (2003). Seasonal variation in the biochemical composition of the chaetognath *Parasagitta elegans* from the hyperbenthic zone of Conception Bay, Newfounde land. - *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 251, 291-200.
- CHOI, J. (1998). Étude des effets biochimiques et écophysiologiques du bichromate de potassium et du fénitrothion sur *Chironomus riparius* (Meigen) (Diptères, Chironomidae) en vue de l'identification expérimentale de biomarqueurs. - Tesis Doctoral. L'universite Paris-Sud (XI). Octobre de 1998.
- CHOI, J., ROCHE, H. & CAQUET, T. (2001). Hypoxia, hiperoxia and exposure to potassium dichromate or fenitrothion alter the energy metabolism in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae) larvae. - *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 130, 11-17.
- 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.
- CHOMCZYNSKI, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. - *BioTechniques*, 15: 532-537.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. -

Analytical Biochemistry, 162: 156-159.

CHURCH, R. & ROBERTSON, F. (1996). A biochemical study of the growth of *Drosophila melanogaster*. - Journal of Experimental Zoology, 162, 337-352.

CICIK, B. & ENGIN, K. (2005). The Effects of Cadmium on Levels of Glucose in Serum and Glycogen Reserves in the Liver and Muscle Tissues of *Cyprinus carpio* (L., 1758). - Turk. J. Vet. Anim. Sci., 29, 113-117.

CLARKE, A., RODHOUSE, P.G., HOLMES, L.J. & PASCOE, P.L. (1989). Growth rate and nucleic acid ratio in cultured cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). - Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 133, 229-240.

CLARKE, G. M. (1994). Developmental stability analysis: an early-warning system for biological monitoring of water quality. - Australian Biologist, 7 (2), 94-104.

CLARKE, G. M. (1995). Between developmental stability and fitness: Application for conservation biology. - Conserv. Biol., 9 (1): 18-24.

CLEMMESSEN, C. (1987). Laboratory studies on RNA/DNA ratios of starved and fed herring (*Clupea harengus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae.- Conseil International pour l'Exploration de la Mer 43:122-128.

CLEMMESSEN, C. (1993). Improvements in the fluorimetric determination of the RNA and DNA content of individual marine fish larvae. - Marine Ecology Progress Series, 100,177-183.

CLEMMESSEN, C. (1996). Importance and limits of RNA/DNA ratios as a measure of nutritional condition in fish larvae. En Watanabe, Y., Yamashita, Y. & Oozeki, Y. Eds. *Survival strategies in early life stages of marine resources*. - Proceeding of International Workshop, Yokohama, Japan, A. A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands.67-82.

CLEMMESSEN, C., BUHLER, V., CARVALHO, G., CASE, R., KJESBU, O., MEMPEL, H., MOKSNESS, E., OTTERAA, H., PAULSEN, H. & THORSEN, A. (2003). Variability in condition and growth of Atlantic cod larvae and juveniles reared in mesocosms: environmental and maternal effects. Journal of Fish Biology, 62: 706-723.

CLEVELAND, L., FAIRCHILD, J. F. & LITTLE, E. E. (2000). Biomonitoring and ecotoxicology: fish as indicators of pollution-induced stress in aquatic systems. - En Gerhardt, A. (Ed.). Biomonitoring of polluted

- water. Trans Tech Publications, Switzerland. pp. 135-292.
- COBO, F. (1988). Los Quironómidos (Diptera: Chironomidae) de los ríos Ulla y Sar. Estudio faunístico y ecológico. - Tesis doctoral. Univ. Santiago de Compostela, España. 488 pp.
- COBO, F. & GONZÁLEZ, M. A. (1991). Etude de la dérive des exuvies nymphales de Chironomidés dans la rivière Sar (NO. Espagne). - Spixiana, 14 (2), 193-203.
- COBO, F., GONZÁLEZ, M. A. & RAMIL, J. (1989). Quironómidos (Diptera: Chironomidae) del río Ulla, I. - Bol. Asoc. esp. Entom., 13, 301-310.
- COBO, F., SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, J., VIEIRA-LANERO, R., & SERVIA, M. J. (2013). Organic pollution induces domestication-like characteristics in feral populations of brown trout (*Salmo trutta*). Hydrobiologia, 705(1), 119-134.
- COCHRANE, B. J., & LEBLANC, G. A. (1986). Genetics of xenobiotic metabolism in *Drosophila*: I. Genetic and environmental factors affecting glutathione-s-transferase in larvae. - Biochemical pharmacology, 35(10), 1679-1684.
- COFFMAN, W. P. (1979). Neglected characters in pupal morphology as tools in taxonomy and phylogeny of Chironomidae (Diptera). - Ent. Scand. Suppl., 10, 37-46.
- CONGLETON, J. L. & WAGNER, T. (2006). Blood-chemistry indicators of nutritional status in juvenile salmonids. - J.Fish. Biol., 69, 473-490.
- CRANSTON, P. S. (1995). Morphology. - En Armitage, P., Cranston, P. S. & Pinder, L. C. V. (Eds.). The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges. Chapman & Hall, London. pp. 11-30.
- CUSHMAN, R. M. (1984): Chironomid deformities as indicators of pollution from a synthetic, coal-derived oil. - Freshwat. Biol., 14: 179-182

-D-

- DAGG, M.J. & LITTLEPAGE, J.L. (1972). Relationships between growth rate and RNA, DNA, protein and dry weight in *Artemia salina* and *Euchaeta elongata*. Marine Biology, 17: 162-170
- DARBY, R. E. (1962). Midges associated with California rice fields, with special reference to their ecology (Dip. Chir.). - Hilgardia, 32, 1-206.

- DAMÁSIO, J., TAULER, R., TEIXIDÓ, E., RIERADEVALL, M., PRAT, N., RIVA, M. C., SOARES, A. M. V. M. & BARATA, C. (2008). Combined use of *Daphnia magna* in situ bioassays, biomarkers and biological indices to diagnose and identify environmental pressures on invertebrate communities in two Mediterranean urbanized and industrialized rivers (NE Spain). - *Aquat. Toxicol.*, 87, 310–320.
- DARVILLE, R. G., HARMON, H. J., SANBORN, M. R. & WILHM, J. L. (1983). Effect of naphthalene on the hemolymph ion concentrations of *Chironomus attenuatus* and the possible mode of action. - *Environ. Toxicol. Chem.*, 2, 423-429.
- DEAK, P. & LAUFER, H. (1995) Ecdysteroid receptor in *Chironomus thummi* (Diptera: Chironomidae). - *Eur. J. Entomol.* 92: 251–7.
- DEAK, P., ZAVORSZKY, P., & MAROY, P. (1988) Moulting hormone regulates its receptor level in *Drosophila melanogaster*. - *Insect Biochem.* 18:847–852.
- DE COEN, W. M., & JANSSEN, C. R. (1998). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. - *Hydrobiologia*, 367, 199-209.
- DE COEN, W. M. & JANSSEN, C. R. (2003 A). A multivariate biomarker-based model predicting population-level responses of *Daphnia magna*. - *Environ. Toxicol. Chem.*, 22, 2195-2201.
- DE COEN, W. M. & JANSSEN, C. R. (2003 B). The missing biomarker link: relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. - *Environ. Toxicol. Chem.*, 22, 1632-1641.
- DELL'ANNO, A., FABIANO, M., DUINEVELD, G. C. A., KOK, A. & DANOVARO, R. (1998). Nucleic acid (DNA, RNA) quantification and RNA/DNA ratio determination in marine sediments: Comparison of spectrophotometric, fluorometric and high performance liquid chromatography methods and estimation of detrital DNA. - *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3238-3245
- DEPLEDGE, M. H., AMARAL-MENDES, J. J., DANIEL, B., HALBROOK, R. S., KLOPPER-SAMS, P., MOORE, M. N. & PEAKALL, D. B. (1993). Chapter 2: The conceptual basis of the biomarker approach. - En: Biomarker. (Eds: D. B. Peakall and L. R. Shugart), NATO ASI Series, 68H, 15-29.
- DEPLEDGE, M. H. & FOSSI, M. C. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. - *Ecotoxicology*, 3,

161-172.

- DERMOTT, R. M. (1991): Deformities in larval *Procladius* spp. and dominant *Chironomini* from the St. Clair River. - *Hydrobiologia*, 219: 171-185
- DÍAZ-FIERROS, F. (2000). Procesos de contaminación difusa del agua en áreas urbanas y periurbanas de la cuenca del río Sar. - Tesis doctoral. Univ. Santiago de Compostela, España. 480 pp.
- DICKMAN, M., BRINDLE, I. & BENSON, M. (1992): Evidence of teratogens in sediments of the Niagara River Watershed as reflected by chironomid (Diptera: Chironomidae) deformities. - *J. Great Lakes Res.*, 18(3): 467-480.
- DIGGINS, T. P. & STEWART, K. M. (1993): Deformities of aquatic larval midges (Chironomidae: Diptera) in the sediments of the Buffalo River, New York. - *J. Great Lakes Res.*, 19(4): 648-659
- DORTCH, Q., ROBERTS, T., CLAYTON, J. JR & AHMED, S. (1983). RNA/DNA ratios and DNA concentrations as indicators of growth rate and biomass in planktonic marine organisms. - *Marine Ecology Progress Series*, 13, 61-71.
- DUTRA, B. K., CASTIGLIONI, D.S., SANTOS, R.B., BOND-BUCKUP, G. & OLIVEIRA, G. T. (2007). Seasonal variations of the energy metabolism of two sympatric species of *Hyaletta* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) in the southern Brazilian highlands. - *Comp. Biochem. Physiol., Part A*, 148, 239-247.
- DUTRA, B. K., ZANK, C., DA SILVA, K. M., CONTER, M. R. & OLIVEIRA, G. T. (2008). Seasonal variations in the intermediate metabolism of the crayfish *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) in the natural environment and experimental culture. - *Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre*, 98, 355-361.

-E-

- EDGAR, W. D. & MEADOWS, P. S. (1969). Case, construction, movement, spatial distribution and substrate selection in the larvae of *Chironomus riparius* Meigen. - *J. Exp. Biol.*, 50, 247-253.
- ELSER, J.J., KYLE, M.M., SMITH, M.S. & NAGY, J.D. (2007). Biological stoichiometry in human cancer. - *PLoS ONE*, 2:, e1028.

- ENAYATI, A. A., RANSON, H. & HEMINGWAY, J. (2005) Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.* 14, 3–8
- EPA (2000) *Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates*. Second Edition. United States Environmental Protection Agency, Washington.
- ESTEVES, E., CHÍCHARO, M. A., PINA, T., COELHO, M. L. & ANDRADE, J. P. (2000). Comparison of RNA/DNA ratios obtained with two methods for nucleic acid quantification in gobiid larvae. - *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 245, 43-55.

-F-

- FEDER, M. E. & HOFMANN, G. E. (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. - *Annu. Rev. Physiol.* 61, 243–82;
- FEYEREISEN, R. (1999) Insect P450 enzymes. - *Annu. Rev. Entomol.* 44, 507–33
- FIGUEROA, L., LEMUS, M. J., SEGNINI, M. I. & CHUNG, K. S. (1996). Sublethal effects of copper and cadmium growth RNA/DNA ratio. - Congress on the biology of fish, San Francisco.
- FONSECA, V., SERAFIM, Â., COMPANY, R., BEBIANNO, M. J. & CABRAL, H. (2009). Effect of copper exposure on growth, condition indices and biomarker response in juvenile sole *Solea senegalensis*. - *Sci. Mar.*, 73, 51-58.
- FOSTER, A. R., HOULIHAN, D. F., GRAY, C., MEDALE, F., FAUCONNEAU, B., KAUSHIK, S. J. & LE BAIL, P. Y. (1991). The effects of ovine growth hormone on protein turnover in rainbow trout. - *General and Comparative Endocrinology*, 82, 111-120.
- FOSTER, A. R., HOULIHAN, D. F., HALL, S. J. & BURREN, L. J. (1992). The effects of temperature acclimation on protein synthesis rates and nucleic acid content of juvenile cod (*Gadus morhua* L.). - *Canadian Journal of Zoology*, 70, 2095-2102.
- FRANTZIS, A., GREMARE, A. & VETION, G. (1992). Growth rates and RNA /DNA ratios in *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fed on benthic macrophytes. - *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 156, 125-138.

- FUKUDA, M., SAKO, H., SHIGETA, T. & SHIBATA, R. (2001). Relationship between growth and biochemical indices in laboratory-reared juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), and its application to wild fish. - *Marine Biology*, 138: 47-55.
- FRANK, C. (1981). Glycolytic capacity of chironomid larvae from polluted and unpolluted waters. - *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 21, 1627-1630.
- FREDJ, F. B., IRIE, M., HAN, J., YAMADA, P., LIMAM, A., GHRABI, A., & ISODA, H. (2010). Stress response of heavy metal mixture present in wastewater and leachate on heat-shock protein 47-transfected cells. - *Environmental toxicology and chemistry*, 29(7), 1637-1647.
- FUENTES, C., GREEN, A. J., ORR, J. & ÓLAFSSON, J. S. (2005). Seasonal Variation in species composition and larval size of the benthic chironomid communities in brackish wetlands in southern Alicante, Spain. - *Wetlands*, 25, 289-296.
- G-
- GAGNAIRE, B., GEFFARD, O., XUEREB, B., MARGOUM C. & GARRIC, J. (2008). Cholinesterase activities as potential biomarkers. Characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Müller 1774). - *Chemosphere*, 71, 553-560.
- GALAP, C., LÉBOULENGER, F. & GRILLOT, J.-P. (1997). Seasonal variations in biochemical constituents during the reproductive cycle of the female dog cockle *Glycymeris glycymeris*. - *Mar. Biol.* 129, 625-634.
- GARCÍA, A., CORTÉS, D. & RAMÍREZ, T. (1998). Daily larval growth and RNA and DNA content of the NW Mediterranean anchovy *Engraulis encrasicolus* and their relationship to the environment. - *Marine Ecology Progress Series*, 166, 237-245.
- GARDEA-TORRESDEY, J. L., CANO-AGUILERA, I., WEBB, R. & GUTIÉRREZ-CORONA, F. (1997): Enhanced copper adsorption and morphological alterations of cells of copper-stressed *Mucor rouxii*. - *Environ. Tox. Chem.*, 16(3): 435-441
- GEHRING, U. (1998) Steroid hormone receptors and heat shock proteins. - *Vitam. Horm.* 54, 167- 205
- GENDIMENICO, G.J., BOUQUIN P.L. & TRAMPOSCH, K.M. (1988).

- Diphenylamine colorimetric method for DNA assay: A shortened procedure by incubating samples at 50 °C. - Anal. Biochem., 173, 45-48.
- GERHARDT, A. (2000). Biomonitoring for the 21st Century. -En Gerhardt, A. (Ed.). *Biomonitoring of polluted water*. Trans Tech Publications, Switzerland. pp. 1-12.
- GERHARDT, A. & JANSSENS DE BISTHOVEN, L. (1995). Behavioural, developmental and morphological responses of *Chironomus gr. thummi* larvae (Diptera, Nematocera) to aquatic pollution. - J. Aquat. Ecosyst. Health, 4, 205-214.
- GILBERT, L. I. & WARREN, J. T. (2005) A molecular genetic approach to the biosynthesis of the insect steroid molting hormone. - Vitam. Horm. 73, 31-57.
- GILLIERS, C., AMARA, R., BERGERON, J. P. & LE PAPE, O. (2004). Comparison of growth and condition indices of juvenile flatfish in different coastal nursery grounds. - Environ. Biol. Fish., 71, 189-198.
- GISMONDI E, BEISEL JN, COSSU-LEGUILLE C. (2012). Influence of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of *Gammarus roeseli*. -Environmental Research 118, 47-52
- GLÉMET, H. & RODRIGUEZ, M. A. (2007). Short-term growth (RNA/DNA ratio) of yellow perch (*Perca flavescens*) in relation to environmental influences in a shallow fluvial lake. - Can. J. Fish. Aquat. Sci., 64, 1646-1655.
- GREENFIELD, B. K., THE, S., ROSS, J. R. M., HUNT, J., ZHANG, G., DAVIS, J., ICHIKAWA, G., CRANE, D., HUNG, S. S. O., DENG, D., THE, F. & GREEN, P. G. (2008). Contaminant Concentrations and Histopathological Effects in Sacramento Splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*). - Arch. Environ. Contam. Toxicol., 55, 270-281.
- GUELORGET, O. & PERTHUISOT, J. P., (1984). Indicateurs biologiques et diagnose écologique dans le domaine paralique. - Bull. Ecol., 15, 1, 67-176.
- GODDEERIS, B. R., VERMEULEN, A. C., DE GEEST, E., JACOBS, H., BAERT, B. & OLLEVIER, F. (2001). Diapause induction in the third and fourth instar of *Chironomus riparius* (Diptera) from Belgian lowland brooks. - Arch. Hydrobiol., 150, 307-327.
- GONZÁLEZ, A., SORIANO, Ó., & JIMÉNEZ, G. (2015). The use of the

- developmental rate of the aquatic midge *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) in the assessment of the postsubmersion interval. *Journal of forensic sciences*, 60(3), 822-826.
- GOROKHOVA, E., AND KYLE, M. (2002). Analysis of nucleic acids in *Daphnia*: development of methods and ontogenetic variations in RNA-DNA content. - *J. Plankton Res.* 24, 511-522.
- GROENENDIJK, D., KRAAK, M. H. S. & ADMIRAAL, W. (1999). Efficient shedding of accumulated metals during metamorphosis in metal-adapted populations of the midge *Chironomus riparius*. - *Environ. Toxicol. Chem.*, 18 (6), 1225-1231.
- GUI, Z., HOU, C., LIU, T., QIN, G., LI, M. & JIN, B. (2009) Effects of insect viruses and pesticides on glutathione S-transferase activity and gene expression in *Bombyx mori*. - *J. Econ. Entomol.* 102, 1591-8.
- GUITTARD, E., BLAIS, C., MARIA, A., PARVY, J. P., PASRICHA, S., LUMB, C. & DAUPHIN-VILLEMANT, C. (2011). CYP18A1, a key enzyme of drosophila steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis. - *Developmental biology*, 349(1), 35-45.
- GUO, R., & KI, J. S. (2012). Differential transcription of heat shock protein 90 (HSP90) in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* by copper and endocrine-disrupting chemicals. - *Ecotoxicology*, 21(5), 1448-1457.
- GWAK, W. & TANAKA, M. (2001). Developmental change in RNA: DNA ratios of fed and starved laboratory - reared Japanese flounder larvae and juveniles, and its application to assessment of nutritional condition for wild fish. - *Journal of Fish Biology*, 59, 902-915.
- GWAK, W., & TANAKA, M. (2002). Changes in RNA, DNA and protein contents of laboratory-reared Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* during metamorphosis and settlement. - *Fisheries Sci.*, 68, 27-33.

-H-

- HA, M. H. & CHOI, J. (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, 31-39.
- HAINES, T. A. (1980). Seasonal patterns of muscle RNA/DNA in black crappie *Pomoxis nigromaculatus*. - *Env. Biol. Fish.*, 5, 1, 67-70.

- HÄMÄLÄINEN, H. (1999): Critical appraisal of the indexes of chironomid larval deformities and their use in bioindication. - *Ann. Zool. Fennici*, 36, 179-186.
- HAMILTON, A. L. & SAETHER, O. A. (1971): The occurrence of characteristic deformities in the chironomid larvae of several Canadian lakes. - *Can. Ent.*, 103, 363-368.
- HAMBURGER, K., DALL, P. C. & LINDEGAARD, C. (1994). Energy metabolism of *Chironomus anthracinus* (Diptera: Chironomidae) from the profundal zone of Lake Esrom, Denmark, as a function of body size, temperature and oxygen concentrations. - *Hydrobiologia*, 294, 43-50.
- HAMBURGER, K., DALL, P. C. & LINDEGAARD, C. (1995). Effects of oxygen deficiency on survival and glycogen content of *Chironomus anthracinus* (Diptera, Chironomidae) under laboratory and field conditions. - *Hydrobiologia*, 297, 187-200.
- HAMBURGER, K., DALL, P. C. & LINDEGAARD, C. (1996). The role of glycogen during the ontogenesis of *Chironomus anthracinus* (Chironomidae, Diptera). - *Hydrobiologia*, 318, 51-59.
- HAMBURGER, K., DALL, P. C., LINDEGAARD, C. & NILSON, I. B. (2000). Survival and energy metabolism in an oxygen deficient environment. Field and laboratory studies on the bottom fauna from the profundal zone of Lake Esrom, Denmark. - *Hydrobiologia*, 432, 173-188.
- HARNISCH, O. (1954), Die physiologische Bedeutung der präanaln Tubuli der Larve von *Chironomus thummi*. - *Zool. Anz.*, 153, 204-211.
- HARE, L. & CARTER, J. C. H. (1976): The distribution of *Chironomus cucini* (salinarius group) larvae (Diptera: Chironomidae) in Parry Sound, Georgian Bay, with particular reference to structural deformities. - *Can. J. Zool.*, 54, 2129-2134.
- HARRAHY, E. A. & CLEMENTS, W. H. (1997). Toxicity and bioaccumulation of a mixture of heavy metals in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) in synthetic sediment. - *Environ. Toxicol. Chem.*, 16 (2), 317-327.
- HARTL, F. U., & HAYER-HARTL, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561), 1852-1858.
- HASSAN, P. (2005). *La carta de la tierra en acción*. Amsterdam: KIT Publishers,

- HEILMAYER, O., DIGIALLEONARDO, J., QIAN, L. & ROESIJADI, G. (2008). Stress tolerance of a subtropical *Crassostrea virginica* population to the combined effects of temperature and salinity. - Estuar. Coast. Shelf. S., 79, 179-185.
- HELLAWELL, J. M. (1986). *Biological indicators of freshwater pollution and environmental management*. - Elsevier Applied Science Publishers, Essex. 546 pp.
- HEINIMAA, S. (2004). Seasonal changes of liver glycogen content and condition factor of wild Atlantic salmon parr in a sub-arctic river. - Ecol. Freshw. Fish., 13, 323-326.
- HEINIS, F. & SWAIN, W. R. (1986): Impedance conversion as a method of research for assessing behavioral responses of aquatic invertebrates. - Hydrobiol. Bull., 19, 183-192.
- HEINIS, F., TIMMERMANS, K. R. & SWAIN, W. R. (1990). Short-term sublethal effects of Cd on the filter-feeding chironomid larva *Glyptotendipes pallens* (Meigen) (Diptera). - Aquat. Toxicol., 16, 73-86.
- HEMINGWAY, J., HAWKES, N., PRAPANTHADARA, L., JAYAWARDENAL, K. G. & RANSON, H. (1998) The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. - Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 358, 1695-9.
- HERNÁNDEZ, J. M., TOMÉ, M. & BAHILLO, P. (1999): An interesting teratological case in *Iberodorcadion (Hispanodorcadion) heydeni* (Kraatz, 1870) (Coleoptera, Cerambycidae). - Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat., 95(3-4), 69-71.
- HERRERO, O. (2013) Efectos citotóxicos de los ftalatos: identificación de biomarcadores moleculares de ecotoxicidad en larvas acuáticas de *Chironomus riparius* (Diptera). Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- 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.
- HERRERO, Ó., PLANELLÓ, R., & MORCILLO, G. (2016). The ribosome biogenesis pathway as an early target of benzyl butyl phthalate (BBP) toxicity in *Chironomus riparius* larvae. Chemosphere, 144, 1874-1884.

- HIRTHE, G., FISHER, T. C., CRANE, M. & CALLAGHAN, A. (2001). Short-term exposure to sub-lethal doses of lindane affects developmental parameters in *Chironomus riparius* Meigen, but has no effect on larval glutathione-S-transferase activity. - *Chemosphere*, 44, 583-589.
- HOBACK, W. W. & STANLEY, D. W. (2001). Insects in hypoxia. - *J. of Insect Physiol.*, 47, 533-542.
- HOFFMAN, J. & KATZ, U. (1998). Glyconeogenesis and urea synthesis in the toad *Bufo viridis* during acclimation to water restriction. - *Physiological zoology*, 71, 85-92.
- HÖÖK, T. O., GOROKHOVA, E. & HANSSON, S. (2008). RNA:DNA ratios of Baltic Sea herring larvae and copepods in embayment and open sea habitats. - *Estuar.Coast. Shelf. S.*, 76, 29-35.
- HUDSON, L. A. & CIBOROWSKI, J. J. H. (1996a): Spatial and taxonomic variation in incidence of mouthpart deformities in midge larvae (Diptera: Chironomidae: Chironomini). - *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53: 297-304.
- HUDSON, L. A. & CIBOROWSKI, J. J. H. (1996b): Teratogenic and genotoxic responses of larval *Chironomus salinarius* group (Diptera: Chironomida
- HYNE, R. V. & MAHER, W. A. (2003). Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotox. Environ. Safe.*, 54, pp 366-374.
- |-
- IBIAM, U. & GRANT, A. (2005). RNA/DNA relations as a sublethal endpoint for large-scale toxicity tests with the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24, 5, 1155-1159
- INEICHEN, H., MEYER, B. & LEZZI, M. (1979). Determination of the developmental stage of living fourth instar larvae of *Chironomus tetans*. *Dev. Biol.* 98, 278-286.
- ISLAM, M.S. & TANAKA, M. (2005). Nutritional condition, starvation status and growth of early juvenile Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) related to prey distribution and feeding in the nursery ground. - *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 323, 172-183.

-J-

- JANSSENS DE BISTHOVEN, L., HUYSMANS, C. & OLLEVIER, F. (1995): The in situ relationships between sediment concentrations of micropollutants and morphological deformities in *Chironomus gr. thummi* larvae (Diptera, Chironomidae) from lowland rivers (Belgium): a spatial comparison. - En Cranston, P. S. (Ed.). *Chironomids: From genes to ecosystems*. CSIRO Publications, Canberra. pp. 63-80.
- JANSSENS DE BISTHOVEN, L., HUYSMANS, C., PARREN, P., POSTMA, J., VERMEULEN, A., THEUNISSEN, B., TIMMERMANS, K., VANDELANOOTE, A. & OLLEVIER, F. (1993): The use of midge larvae (Diptera, Chironomidae) as biological indicators for environmental pollution, with special attention for sediment stress. - Environmental Platform. Catholic University Leuven.
- JANSSENS DE BISTHOVEN, L., NUYTS, P., GODDEERIS, B. & OLLEVIER, F. (1998): Sublethal parameters in morphologically deformed *Chironomus* larvae: clues to understanding their bioindicator value. - Freshwat. Biol., 39, 179-191.
- JANSSENS DE BISTHOVEN, L. & OLLEVIER, F. (1989): Some experimental aspects of sediment stress in *Chironomus gr. thummi* larvae (Diptera: Chironomidae). - Acta Biol. Debrec. Suppl. Oecol. Hung., 3, 147-155.
- JANSSENS DE BISTHOVEN, L. & SPEYBROECK, D. VAN (1994): Some observations of deformed midge larvae (Diptera, Chironomidae) in Kenya. - Verh. Internat. Verein. Limnol., 25, 2485-2489.
- JANSSENS DE BISTHOVEN, L., TIMMERMANS, K. R. & OLLEVIER, F. (1992): The concentration of cadmium, lead, copper and zinc in *Chironomus gr. thummi* larvae (Diptera, Chironomidae) with deformed versus normal menta. - Hydrobiologia, 239, 141-149.
- JEMEC, A., TIŠLER, T., DROBNE, D., SEPČIĆ, K., JAMNIK, P. & ROŠ, M. (2008). Biochemical biomarkers in chronically metal-stressed daphnids. - Comp. Biochem. Phys. C., 147, 61-68.
- JOUBERT, A. (2000). Evaluation of biomarkers for pollution in *Oreochromis mossambicus*. A laboratory and field study. - Tesis Doctoral. Departament of zoology, Faculty of science, Rand Afrikaans University. Noviembre de 2000.
- JOYNER-MATOS, J., CHAPMAN, L. J., DOWNS, C. A., HOFER, T., LEEUWENBURGH, C. & JULIAN, C. (2007). Stress response of a

freshwater clam along an a biotic gradient: too much oxygen may limit distribution. - *Funct. Ecol.*, 21, 344-355.

-K-

KANSANEN, P. H., AHO, J. & PAASIVIRTA, L. (1984). Testing the benthic lake type concept based on chironomid associations in some Finnish lakes using multivariate statistical methods. - *Ann. Zool. Fennici.*, 21, 55-76.

KARLSSON, J. (1979). Some features of glycogen metabolism in human skeletal muscle. - *Bibliotheca Nutritio et Dieta*, 27, 121-125.

KAROUNA-RENIER, N. K., & ZEHR, J. P. (2003). Short-term exposures to chronically toxic copper concentrations induce HSP70 proteins in midge larvae (*Chironomus tentans*). - *Science of the total environment*, 312(1-3), 267-272.

KAWAI, K., YAMAGISHI, T., KUBO, Y. & KONISHI, K. (1989). Usefulness of chironomid larvae as indicators of water quality. - *Jpn. J. Sanit. Zool.*, 40 (4), 269-283.

KAYSER, H., WINKLER, T. & SPINDLER-BARTH, M. (1997) 26-hydroxylation of ecdysteroids is catalyzed by a typical cytochrome P-450- dependent oxidase and related to ecdysteroid resistance in an insect cell line. - *Eur. J. Biochem.* 248, 707-16.

KENNEL, D. & MAGASANIK, B. (1962). The relation of ribosome content to the rate of enzyme synthesis in *Aerobacter aerogenes*. - *Biochimica et Biophysica Acta*, 55, 139.

KLINK, A. (1984). Kopafwijkingen bij Chironomidae-larven onder invloed van chemische verontreiniging. - *Meded. Hydrobiol. Adviesburo K. Wageningen Rapp.* 12, 1-31.

KOLKWITZ, R. & MARSSON, M. (1908). Ökologie der pflanzlichen Saprobien. - *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 26A, 505-519.

KOKWITZ, R. & MARSSON, M. (1909). Okologie der tierischen Saprobien. Beitrage zur Lehre von des biologischen Gewasserbeurteilung. - *Int. Rev. Ges. Hydrobio.*, 2, 126-152.

KOOP, J. H. E., SCHÄFFER, M., ORTMANN, C. & WINKELMANN, C. (2008). Towards environmental assessment of river ecosystems by analyzing

- energy reserves of aquatic invertebrates. - *Limnologica*, 38, 378-387.
- KOSALWAT, P. & KNIGHT, A. W. (1987). Chronic toxicity of copper to a partial life cycle of the midge *Chironomus decorus*. - *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 16, 283-290.
- KOŠTÁL, V. (2006). Eco-physiological phases of insect diapause. - *J. Insect. Physiol.*, 52, 113-127
- KOWALYK, H. E. (1985). The larval cephalic setae in the Tanypodinae (Diptera: Chironomidae) and their importance in generic determinations. - *Can. Ent.*, 117: 67-106.
- KOWNACKI, A. (1989). Taxocenes of Chironomidae as an indicator for assessing the pollution of rivers and streams. - *Acta Biol. Debr. Oecol. Hung.*, 3, 219-230.
- KRANTZBERG, G. & STOKES, P. M. (1988). The importance of surface adsorption and pH for metal accumulation by Chironomids. - *Environ. Toxicol. Chem.*, 7, 653-670.
- KRANTZBERG, G. & STOKES, P. M. (1989). Metal regulation, tolerance, and body burdens in the larvae of the genus *Chironomus*. - *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46, 389-398.
- KRANTZBERG, G. & STOKES, P. M. (1990). Metal concent relations and tissues distribution in larvae of *Chironomus* with reference to X-ray microprobe analysis.- *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19, 84-93.
- KUIKEN, T., FOX, G. A. & DANESK, K. (1999): Bill deformities in double-crested cormorants with low exposure to organochlorines. - *Environ. Tox. Chem.*, 18(12), 2908-2913.

-L-

- LAGADIC, L.; CAQUET, T.; AMIARD, J.C. & RAMADE, F. (1997). Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualite de l'environnement. Lavoisier, Paris.
- LANGER-JAESRICH, M., KÖHLER, H. R. & GERHARDT, A. (2010) Assessing toxicity of the insecticide thiacloprid on *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera) using multiple end points. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* ,58, 963-72.
- LANGTON, P. H. (1995). The pupa and events leading to eclosion. - In Armitage,

- P., Cranston, P. S. & Pinder, L. C. V. (Eds.). The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges. Chapman & Hall, London. pp. 169-193.
- LAVILLE, H. & VIAUD-CHAUVET, M. (1985). Etude comparée de la structure des peuplements de Chironomidés dans cinq rivières du Massif Central: relation entre cette structure et la qualité des eaux. - Verh. Internat. Verein. Limnol., 22, 2261-2269.
- LEARY, R. F. & ALLENDORF, F. W. (1989). Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: Implications for conservation biology. - Trends Ecol. Evol., 4, 214-217.
- LEE, S. M., LEE, S. B., PARK, C. H. & CHOI, J. (2006) Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. - Chemosphere 65, 1074-81.
- LENAT, D. R. (1983). Chironomid taxa richness: natural variation and use in pollution assessment. - Freshwat. Invertebr. Biol., 2 (4), 192-198.
- LEWIS, D. F. V. & ITO, Y. (2008) Cytochrome P450 structure and function: an evolutionary perspective. *En Cytochromes P450. Role in the Metabolism and Toxicity of Drugs and Other Xenobiotics*. Issues in Toxicology (C. Ioannides ed.) RSC Publishing, Cambridge.
- LIED, E., ROSENLUND, G., LUND, B. & VON DER DECKEN, A. (1983). Effect of starvation and refeeding on in vitro protein synthesis in white trunk muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*). - Comparative Biochemistry and Physiology 76B, 777-781.
- LINDEGAARD, C. (1992). Zoobenthos ecology of Thingvallavatn: vertical distribution, abundance, population dynamics and production. - Oikos, 64 (1-2), 257-304.
- LINDEGAARD, C. (1997). Diptera Chironomidae, non-biting midges.- In Nilson, A. (Ed.). Aquatic insects of North Europe. A taxonomic handbook. Volume 2: Odonata - Diptera. Apollo Books, Stenstrup. pp. 265-294.
- LIU, T., DANIELS, C. K. & CAO, S. (2012) Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. - Pharmacol. Ther. 136, 354-74.

- LIVINGSTONE, D.R. (1993). Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. - J. Chem. Technol. Biotechnol., 57, 3, 195-211.
- LODEIROS, C., FERNANDEZ, R., BONMATI, A., HIMMELMAN, J. & CHUMG, K. S. (1996). Relation of RNA/DNA ratios to growth for the scallop *Euvola (Pecten) ziczac* in suspended culture. - Marine Biology, 129, 3-13.
- LOWER, W. R. & KENDALL, R. J. (1990). Sentinel species and sentinel bioassay. - En: McCarthy JF & Shugart LR, (eds.). *Biomarkers of Environmental Contamination* Boca Raton, FL Lewis; 309-331.
- LUBCHENKO, J., OLSON, A. M., BRUBAKER, L. B., CARPENTER, S. R., HOLLAND, M. M., HUBBELL, S. P., LEVIN, S. A., MACMAHON, J. A., MATSON, P. A., MELILLO, J. M., MOONEY, H. A., PETERSON, C. H., PULLIAM, H. R., REAL, L. A., REGAL, P. J. & RISSER, P. G. (1991). The sustainable biosphere initiative: an ecological research agenda. - Ecology, 72, 371-412.

-M-

- MACDONALD, D. D., INGERSOLL, C. G., & BERGER, T. A. (2000). Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. - Archives of environmental contamination and toxicology, 39(1), 20-31.
- MACKEY, A. P. (1977). Growth and development of larval Chironomidae. - Oikos, 28, 270-275.
- MADDEN, C. P., AUSTIN, A. D. & SUTER, P. J. (1995): Pollution monitoring using Chironomid larvae: What is a deformity? - En Cranston, P. S. (Ed.). *Chironomids: From genes to ecosystems*. CSIRO Publications, Canberra. pp. 89-100.
- MADRIGAL-MATUTE, J., LÓPEZ-FRANCO, Ó., BLANCO- COLIO, L. M., MUÑOZ-GARCÍA, B., RAMOS-MOZO, P. & VAN OOSTROM, M. (2009) Las proteínas de choque térmico (heat shock proteins) como potenciales dianas terapéuticas en aterosclerosis. - Clin. Investig. Arterioscler. 21:,163-172.
- MADDEN, C. P., SUTER, P. J., NICHOLSON, B. C. & AUSTIN, A. D. (1992): Deformities in chironomid larvae as indicators of pollution (pesticide) stress. - Neth. J. Aquat. Ecol., 26(2-4), 551-557.

- MAIER, K. J. & KNIGHT, A. W. (1993). Comparative acute toxicity and bioconcentrations of selenium by the midge *Chironomus decorus* exposed to selenate, selenite, and seleno-DL-methionine. - Arch. Environ. Contam. Toxicol., 25, 365-370.
- MANNERVIK, B., ALIN, P, GUTHENBERG, C., JENSSON, H., TAHIR, M. K., & WARHOLM, M. (1985) Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. - Proc. Natl.Acad. Sci. U. S.A. 82, 7202-6.
- MARTINEZ, E. A., MOORE, B. C., SCHAUMLOFFEL, J., & DASGUPTA, N. (2003). Morphological abnormalities in *Chironomus tentans* exposed to cadmium—and copper-spiked sediments. - Ecotoxicology and environmental safety, 55(2), 204-212.
- 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. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 155:333-43
- MARYANSKI, M., KRAMARZ, P., LASKOWSKI, R., & NIKLINSKA, M. (2002). Decreased energetic reserves, morphological changes and accumulation of metals in carabid beetles (*Poecilus cupreus* L.) exposed to zinc-or cadmium-contaminated food. - Ecotoxicology, 11(2), 127-139.
- MATHERS, E.M., HOULIHAN, D. F., MCCARTHY, I.D. & BURREN, L. J. (1993). Rates of growth and protein synthesis correlated with nucleic acid content in fry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of age and temperature. - Journal of Fish Biology, 43, 245-263.
- MATTHEWS, R. A., BUIKEMA, A. L. Jr., CAIRNS, J. Jr. & RODGERS, J. H. Jr. (1982). Biological monitoring. Part IIA. Receiving system functional methods, relationships and indices. - Water Res., 16, 129-139.
- MAYER, M.P. & BUKAU, B. (2005) HSP70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. - Cell. Mol. Life Sci. 62, 670-84;
- MCCAHERN, C. P. & PASCOE, D. (1991). Brief-exposure of first and fourth instar *Chironomus riparius* larvae to equivalent assumed doses of cadmium: effects on adult emergence. - Water, Air and Soil Pollut., 60, 395-403.
- MCCAULEY, V. V. E. (1974). Instar differentiation in larval Chironomidae

- (Diptera). - Can. Ent., 106, 179-200.
- MCGILL, J. D., WILSON, R. S. & BRAKE, A. M. (1979). The use of chironomid pupal exuviae in the surveillance of sewage pollution within a drainage system. - Water Research, 13, 887-894.
- MEESTERS, E., NIEUWLAND, G., DUINEVELD, G., KOK, A. & BAK, R. (2002). RNA/DNA ratios of scleractinian corals suggest acclimatisation / adaptation in relation to light gradients and turbidity regimes. - Marine Ecology Progress Series, 227, 223-239.
- MEIGEN, J. W. (1804) Klassifikation und Beschreibung der europäischen zweiflügeligen Insekten (Diptera Linn.). Karl Reichard, Braunschweig. Vol. 1 : Abt. I. 1-152, Abt. II.. 153 - 295; 298-314.
- MENDOZA, R., AGUILERA, C. & CARREÓN, L. (2002). Ácidos nucleicos para evaluar la condición de larvas de peces. - Ciencia-UANL, 5 (2), 211-217.
- MERCALDO-ALLEN, R.; KUROPAT, C.; CALDARONE, E. M. (2006). A model to estimate growth in young-of-the-year tautog, *Tautoga onitis*, based on RNA:DNA ratio and seawater temperature. - Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 329, 187-195.
- MEREGALLI, G., PLUYMERS, L. & OLLEVIER, F. (2001): Induction of mouthpart deformities in *Chironomus riparius* larvae exposed to 4-n-nonylphenol. - Environ. Poll., 111, 241-246.
- MEWES, D. & WINKELMANN, C. (2015). RNA/DNA ratio as biomarkers for periphyton and macroinvertebrate growth. - Geophysical Research Abstracts. 17. EGU General Assembly.
- MEYER, E. (1990). Levels of major body compounds in nymphs of the stream mayfly *Epeorus sylvicola* (Pict.) (Ephemeroptera: Heptageniidae). - Arch. Hydrobiol., 117, 4, 497-510.
- MORALES, M., PLANELLÓ, R., MARTÍNEZ-PAZ, P., HERRERO, O., CORTÉS, E., & MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L. (2011) Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. - Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 153, 150-8.
- MORCILLO, G., DIEZ, J. L., CARBAJAL, M. E. & TANGUAY, R. M. (1993) HSP90 associates with specific heat shock puffs (hsr omega) in polytene chromosomes of *Drosophila* and *Chironomus*. - Chromosoma 102, 648-59.

- MORCILLO, G., GORAB, E., TANGUAY, R. M. & DÍEZ, J. L. (1997) Specific intranucleolar distribution of Hsp70 during heat shock in polytene cells. - *Exp. Cell Res.* 236, 361-70.
- MORIMOTO, R. I., SARGE, K. D., & ABRAVAYA, K. (1992). Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. - *Journal of Biological Chemistry*, 267(31), 21987-21990.
- MOSLEH, Y. Y., PARIS-PALACIOS, S., COUDERCHET, M. & VERNET, G. (2002). Fate and sublethal effects of isotroturon on mature earthworm (*Lumbricus terrestris* L.). *Mededelingen*, 67, 69-77.
- MU, X., RIDER, C. V., HWANG, G. S., HOY, H. & LEBLANC, G. A. (2005) Covert signal disruption: anti-ecdysteroidal activity of bisphenol A involves cross talk between signaling pathways. - *Environ.Toxicol. Chem.* 24, 146-52.
- MUKHERJEE, S. & JANA, B.B. (2007). Water quality affects SDH activity, protein content and RNA:DNA ratios in fish (*Catla catla*, *Labeo rohita* and *Oreochromis mossambicus*) raised in ponds of a sewage-fed fish farm. - *Aquaculture*, 262, 105-119.
- MUNRO, H. N., & FLECK, A. (1966). The determination of nucleic acids. - *Methods of biochemical analysis*, 113-176.
- N-
- NAGELL, B. & ORRHAGE, L. (1981), On the structure and function of the ventral tubuli of some *Chironomus* larvae. - *Hydrobiologica*, 78, 11-16.
- NAIR, P. M. G. & CHOI, J. (2011 A) Characterization of a ribosomal protein L15 cDNA from *Chironomus riparius* (Diptera; Chironomidae): transcriptional regulation by cadmium and silver nanoparticles. - *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 159, 157-62.
- NAIR, P. M. G. & CHOI, J. (2011 B) Identification, characterization and expression profiles of *Chironomus riparius* glutathione S-transferase (GST) genes in response to cadmium and silver nanoparticles exposure. - *Aquat. Toxicol.* 101, 550-60.
- NAIR, P. M. G. & CHOI, J. (2012) Modulation in the mRNA expression of ecdysone receptor gene in aquatic midge, *Chironomus riparius* upon exposure to nonylphenol and silver nanoparticles. - *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 98-106.

- NATH, B. S. (2002). Shifts in glycogen metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to organophosphorus insecticides toxicity. - Pestic. Biochem. Phys., 74, 73-84.
- NOLTE, U. (1993). Egg masses of Chironomidae (Diptera). A review, including new observations and a preliminary key. - Ent. Scand. Suppl., 43, 1-75.

-O-

- OECD (2004 A) Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD (2004 B) Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OKUMURA, T., NAGASAWA, T., HAYASHI, I. & SATO, S. (2002). Effects of starvation on RNA:DNA ratio, glycogen content, and C:N ratio in columellar muscle of the Japanese turban shell *Turbo (Batillus) cornutus* (Gastropoda). - Fisheries Sci.1, 68, 306-312.
- OLIVAR, M. P., DIAZ, M. V., & CHÍCHARO, M. V. (2009). Tissue effect on RNA:DNA ratios of marine fish larvae. - Sci. Mar., 73, 1, 171-182.
- OLIVEIRA, G. T., ROSSI, I. C., KUCHARSKI, L. C. & DA SILVA, R. S. (2004). Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. - Comparative Biochemistry and Physiology, 137A, 383-390 .
- OLIVER, D. R. (1971). Life history of the Chironomidae. - Annu. Rev. Entomol., 16, 211-230.
- ORTEL, J. (1996). Metal-supplemented diets alter carbohydrate levels in tissue and hemolymph of gypsy moth larvae (*Limantria dispar*, Limantriidae, Lepidoptera). - Environ. Toxicol. Chem., 15, 1171-1176.

-P-

- PALERMO, F. A., MOSCONI, G., ANGELETTI, M., POLZONETTI-MAGNI, A. M. (2008). Assessment of Water Pollution in the Tronto River (Italy) by Applying Useful Biomarkers in the Fish Model *Carassius*

- auratus*. - Arch Environ Contam. Toxicol., 55, 295–304.
- PARK, K. & KWAK, I. S. (2008). Characterization of heat shock protein 40 and 90 in *Chironomus riparius* larvae: effects of di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. - Chemosphere 74, 89–95.
- PARK, K. & KWAK, I. S. (2010). Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. - Chemosphere 79, 934–41.
- PEAKALL, D. (1992). *Animal biomarkers as pollution indicators*. Chapman and Hall, London, UK.108–125.
- PINDER, L. C. V. (1995). Biology of the eggs and first-instar larvae. - En Armitage, P. , Cranston, P. S. & Pinder, L. C. V. (Eds.). *The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges*. Chapman & Hall, London. pp. 87-106.
- PELLETIER, D., BLIER, P. U., LAMBERT, Y. & DUTIL, J-D. (1995). Deviation from the general relationship between RNA concentration and growth rate in fish. - Journal of Fish Biology, 47, 920-922.
- PEPLOW, D. & EDMONDS, R. (2005). The effects of mine waste contamination at multiple levels of biological organization. - Ecol. Eng. 24 101–119.
- PLANELLÓ CARRO, M. (2009). Efectos citotóxicos del cadmio y del bisfenol-A en *Chironomus riparius* (Diptera)| bidentificación de biomarcadores moleculares de ecotoxicidad frente a disruptores endocrinos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid
- PLANELLÓ, R., MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L. & MORCILLO, G. (2008) The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*. - Chemosphere 71, 1870–6.
- 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*. - Sci. Total Environ. 408, 1598–603.
- PLANELLÓ, R., HERRERO, O., MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L., & MORCILLO, G. (2011). Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. - Aquatic toxicology,

105(1-2), 62-70.

- PRATT, W. B. & TOFT, D. O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the HSP90/HSP70-based chaperone machinery. - *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 228, 111-33.
- POSTMA, J. F. & DAVIDS, C. (1995). Tolerance induction and life cycle changes in cadmium-exposed *Chironomus riparius* (Diptera) during consecutive generations. - *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 30, 195-202.
- POSTMA, J. F., BUCKERT-DE JONG, M. C., STAATS, N. & DAVIDS, C. (1994). Chronic toxicity of cadmium to *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) at different food levels. - *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 26,143-148.
- POSTMA, J. F., MOL, S., LARSEN, H. & ADMIRAAL, W. (1995). Life-cycle changes and zinc shortage in cadmium-tolerant midges, *Chironomus riparius* (Diptera), reared in the absence of cadmium. - *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 1, 117-122.
- POSTMA, J. F., NUGTEREN, P. VAN & BUCKERT-DE JONG, M. C. (1996). Increased cadmium excretion in metal-adapted populations of the midge *Chironomus riparius* (Diptera). - *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 332-339.
- R-
- RAAE, A.J., OPSTAD, I., KVENSETH, P. & WALTHER, B.T. (1988). RNA, DNA and protein during early development in feeding and starved cod (*Gadus morhua* L). - larvae. *Aquaculture*, 73, 247-259.
- RAMADE, F. (1979). *Écotoxicologie*. - 2ª ED. Masson, Paris.
- RAMÍREZ, T., CORTÉS, D., GARCÍA, A. (2001). Growth of north Alboran Sea sardine larvae estimated by otolith microstructure, nucleic acids and protein content. - *Journal of Fish Biology*, 59, 403-415.
- RAMÍREZ, T., CORTÉS, D., GARCÍA, A. & CARPENA, A. (2004). Seasonal variations of RNA/DNA ratios and growth rates of the Alboran Sea sardine larvae (*Sardina pilchardus*). - *Fisheries Research*, 68, 57-65.
- RAKOTONDRAVELO, M. L., ANDERSON, T. D., CHARLTON, R. E. & ZHU, K. Y. (2006). Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). - *Arch. Environ.*

- Contam. Toxicol. 51, 360–6.
- RANSON, H., HEMINGWAY, J. (2005 A). Glutathione Transferases. *En* (L.I. Gilbert, K. Iatrou, S.S. Gill eds.) *Comprehensive Molecular Insect Science. Volume 5: Pharmacology* Elsevier, Amsterdam. pp. 383–402.
- REDECKER, B., & ZEBE, E. (1988). Anaerobic metabolism in aquatic insect larvae: studies on *Chironomus thummi* and *Culex pipiens*. - *J. Comp. Physiol. B*, 158, 307-315.
- REPETTO, M. & REPETTO, G. (2009). *Toxicología Fundamental. Cuarta Edición*. Ediciones Díaz de Santos, Madrid.
- REYMLA, S. R., KENNETH, M. R., SAJWAN, S. & KUMAR, K. S. (2008). Influence of zinc on cadmium induced haematological and biochemical responses in a freshwater teleost fish *Catla catla*. - *Fish. Physiol. Biochem.*, 34, 169–174.
- REYNOLDS, S. K. JR. & FERRINGTON, L. C. JR. (2001). Temporal and taxonomic patterns of mouthpart deformities in larval midges (Diptera, Chironomidae) in relation to sediment chemistry. - *J. Freshwat. Ecol.*, 16(1), 15-27
- RIDDIFORD, L. M. (1993). Hormones and *Drosophila* development. *En The development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor, New York. pp. 899–939.
- RITOSSA, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18(12), 571-573.
- ROARK, A.M., BJORN DAL, K.A., BOLTEN, A.B. & LEEUWENBURGH, C. (2009). Biochemical indices as correlates of recent growth in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 376, 59-67.
- RODRÍGUEZ, E. M., MEDESANI, D. A. & FINGERMAN, M. (2007). Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: a review. - *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 146, 661–71.
- ROOKER, J. R. & HOLT, G., J. (1996). Application of RNA:DNA ratios to evaluate the condition and growth of larval and juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). - *Marine and Freshwater Research*, 47, 283-290.
- ROSA, R. & NUNES, M. L. (2003). Seasonal changes in nucleic acids, amino acids and protein content in juvenile Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). - *Mar. Biol.*, 143, 565–572.

- ROSA, R. & NUNES, M. L. (2004). RNA, DNA and protein concent relations and amino acid profiles of deep-sea decapod *Aristeus antennatus*: An indication for seasonal variations of nutrition and growth. - Aquat. Living. Resour., 17, 25–30.
- ROSENBERG, D. M. (1992). Freshwater biomonitoring and Chironomidae. - Neth. J. Aquat. Ecol., 26 (2-4), 101-122.
- ROSENBERG, D. M. & RESH, V. R. (1993). *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*. - Chapman & Hall, Londres. 488 pp.
- ROSENBERG, D. M & WIENS, A. P. (1976). Community and species responses of Chironomidae (Diptera) to contamination of fresh waters by crude oil and petroleum products, with special reference to the Trail River, Northwest Territories. - J. Fish. Res. Bd. Can., 33, 1955-1963.
- RYCKMAN, D. P., WESELOH, D. V., HAMR, P., FOX, G. A., COLLINS, B., EWINS, P. J. & NORSTROM, R. J. (1998). Spatial and temporal trends in organochlorine contamination and bill deformities in double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) from the Canadian Great Lakes. - Environ. Monit. Assess., 53(1), 169-195
- S-
- SAETHER, O. A. (1979). Chironomid communities as water quality indicators. - Holarct. Ecol., 2, 65-74
- SAETHER, O. A. (1980). Glossary of chironomid morphology terminology (Diptera, Chironomidae). - Ent. Scand. Suppl., 14. 1-51.
- SÁNCHEZ-ARGÜELLO, P., FERNÁNDEZ, C. & TARAZONA, J. V. (2009). Assessing the effects of fluoxetine on *Phisa acuta* (Gastropoda, Pulmonata) and *Chironomus riparius* (Insecta, Diptera) using a two-species water-sediment test. - Sci. Total Environ., 407, 1937-1946.
- SANCHO, E., VILLARROEL, M. J., ANDREU, E. & FERRANDO, M. D. (2009). Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole. - Chemosphere, 74, 1171–1178.
- SANTOS, S., VILAR, V. J., ALVES, P., BOAVENTURA, R. A., & BOTELHO, C. (2013). Water quality in Minho/Miño River (Portugal/Spain). - Environmental monitoring and assessment, 185 (4), 3269-3281.
- SATTERWHITE, M. C. (2007). RNA:DNA as an indicator of nutritional condition and growth in larval Naked goby, *Gobiosoma bosca*. Master

- of Science Thesis, Louisiana State University. 53pp
- SHAPIRO, S. S. & WILK, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). - *Biometrika*, 52 (3-4), 591-611.
- SCHILL, R. O., & KÖHLER H.-R. (2005). Energy Reserves and Metal-storage Granules in the Hepatopancreas of *Oniscus asellus* and *Porcellio scaber* (Isopoda) from a Metal Gradient at Avonmouth, UK. - *Ecotoxicology*, 13, 787-796.
- SCHLECHTRIEM, C., JOHANNSSON, O. E., BOWEN, K. L., SMITH, R. W. & ARTS, M. T. (2008). Effect of Fasting under Different Temperature Conditions on Nucleic Acid ratios in the Opossum Shrimp *Mysis relicta*: a Calibration Approach. - *J. Great Lakes Res.*, 34, 461-471.
- SCHNEIDER, W.C. (1957). Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. - In: Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York. 680-684 pp.
- SCHRAMM, M., BEHRENS, A., BRAUNBECK, T., ECKWERT, H., KÖHLER, H. R., KONRADT, J. & TRIEBSKORN, R. (1999). Cellular, histological and biochemical biomarkers. In *Biomonitoring of Polluted Water*. - *Environmental Research Forum*, 98, 33-64. A
- SCOTT, J. G. (1999). Cytochromes P450 and insecticide resistance. - *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 757-77.
- SCOTT, J. G. & WEN, Z. (2001) Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. - *Pest Manag. Sci.* 57, 958-67.
- SERRA-TOSIO, B. (1977). Note sur les Diptères Chironomides de quelques rivières polluées dans la région de Grenoble. - *Trav. Lab. Hydrobiol.*, 66-68, 83-88.
- SERVIA, M. J. (2001). Causalidad, ontogenia y aplicación práctica en la detección del estrés ambiental de la asimetría fluctuante y las deformidades en larvas de *Chironomus riparius* (DIPTERA: Chironomidae) de ecosistemas acuáticos de Galicia. - Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, Spain.
- SERVIA, M. J., COBO, F. & GONZÁLEZ, M. (1998 A): Evaluación del nivel de estrés ambiental en diversos ecosistemas acuáticos de Galicia, mediante el estudio de deformidades en larvas de Quironómidos (Diptera, Chironomidae). - *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 8, 271-280.

- SERVIA, M. J., COBO, F. & GONZÁLEZ, M. (1998 B): Deformities in larval *Prodiamesa olivacea* (Meigen, 1818) (Diptera, Chironomidae) and their use as environmental stress indicators. - *Hydrobiologia*, 385, 153-162.
- SERVIA, M. J., COBO, F. & GONZÁLEZ, M. (1999 A): Sobre la posible repercusión de la presencia de deformidades en el ciclo vital de *Chironomus riparius* Meigen, 1804 (Diptera, Chironomidae). - *Bol. Asoc. esp. Entom.*, 23(1-2), 105-113.
- SERVIA, M. J., COBO, F. & GONZÁLEZ, M. (1999 B): Aparición de deformidades en larvas del género *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) recolectadas en ambientes no alterados. - *Bol. Asoc. esp. Entom.*, 23(3-4), 331-332.
- SERVIA, M. J., COBO, F. & GONZÁLEZ, M. (2000 A): Seasonal and interannual variations in the frequency and severity of deformities in larvae of *Chironomus riparius* Meigen, 1804 and *Prodiamesa olivacea* (Meigen, 1818) (Diptera, Chironomidae) collected in a polluted site. - *Environ. Monit. Assess.*, 64, 617-626.
- SERVIA, M. J., COBO, F. & GONZÁLEZ, M. (2000 B): Incidence and causes of deformities in recently hatched larvae of *Chironomus riparius* Meigen, 1804 (Diptera, Chironomidae). - *Arch. Hydrobiol.*, 149(3), 387-401
- SERVIA, M. J., PÉRY, A. R. R., HEYDORFF, M., GARRIC, J. & LAGADIC, L. (2006 A) .Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. - *Ecotoxicology*, 15, 229-240
- SERVIA, M. J., HEYDORFF, M., PÉRY, A. R. R., GARRIC, J. & LAGADIC, L. (2006 B). Sex- and Developmental Stage-Related Changes in Energy Reserves in Fourth-instar Larvae of the Midge *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae): Implications for Ecotoxicity Testing. - *Environ. Entomol.*, 35, 865-874.
- SETAC (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. Hill, I. R., Matthiessen, P. & Heimbach, F. (Eds.). 105pp.
- SHEFFIELD, S. R. & KENDALL, R. J. (1997). Wildlife species as sentinels of environmental health hazards. - *Environ. Health. Persp.* (en prensa).
- SIBLEY, P. K., BENOIT, D. A. & ANKLEY, G. T. (1997). The significance of growth in *Chironomus tentans* sediment toxicity tests: Relationship to reproduction and demographic endpoints. - *Environ. Toxicol. Chem.*, 16 (2), 336-345.

- SIBLEY, P. K., BENOIT, D. A. & ANKLEY, G. T. (1998). Life cycle and behavioural assessments of the influence of substrate particle size on *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) in laboratory assays. - *Hydrobiologia*, 361, 1-9.
- SIEGERT, K. J. (1987). Carbohydrate metabolism in *Manduca sexta* during late larval development. - *J. Insect Physiol.*, 33, 421-427.
- SILVA-CASTIGLIONI, D., DUTRA, B. K., OLIVEIRA, G. T. & BUCKUP, G. B. (2007). Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Parastacus varicosus* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). - *Comp. Biochem. Phys. A*, 148, 204-213.
- SILVA, S., BARCA, S. & COBO, F. (2016). Advances in the Study of Sea Lamprey *Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758 in the NW of the Iberian Peninsula. *En Jawless Fishes of the World*, Volume 1, Chapter: 14, Cambridge Scholars Publishing, Editors: A. M. Orlov, R. Beamish, Newcastle upon Tyne UK, pp.346-385
- SCHMIDT, G. & THANNHAUSER, S. J. (1945). A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues. - *Journal of Biological Chemistry*, 161, 83-89.
- SMITH, R. W., & OTTEMA, C. (2006). Growth, oxygen consumption, and protein and RNA synthesis rates in the yolk sac larvae of the African catfish (*Clarias gariepinus*). - *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 143(3), 315-325.
- SMOLDERS, R., DE BOECK, G. & BLUST, R. (2003). Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chemistry.*, 22, 890-899.
- SNELL, T. W., BROGDON, S. E. & MORGAN, M. B. (2003). Gene expression profiling in ecotoxicology. - *Ecotoxicology* 12, 475-83.
- SORIANO, O., COBO, F., RIERADEVALL, MY PRAT, N. (1997). *Lista faunística y bibliográfica de los quironómidos (Diptera, Chironomidae) de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Asociación Española de Limnología, Madrid. 210p
- STRENZKE, K. (1959). Revision der Gattung *Chironomus* Meig. I. Die Imagines von 15 norddeutschen Arten und Unterarten. - *Arch. Hydrobiol.*, 56, 1-42.
- STRENZKE, K. & NEUMANN, D. (1960). Die Variabilität der abdominalen

- Körperanhänge aquatischer Chironomidenlarven in Abhängigkeit von der Ionenzusammensetzung des Mediums. - *Biolog. Zentralblatt*, 79, 199-255.
- STRIXINO, G. & STRIXINO, S. T. (1985). A temperatura e o desenvolvimento larval de *Chironomus sancticarioli* (Diptera: Chironomidae). - *Rvta. Bras. Zool.*, S. Paulo, 3(4), 177-180.
- STUIJFZAND, S. C., SHEN, D., HELMS, M. & KRAAK, M. H. S. (1996). Effects of pollution in the river Meuse on the midge *Chironomus riparius*. - *Proc. Exper. & Appl. Entomol.*, 7, pp. 211-216
- STUIJFZAND, S. C., DRENTH, A., HELMS, M. & KRAAK, M. H. S. (1998). Bioassays using the midge *Chironomus riparius* and the zebra mussel *Dreissena polymorpha* for evaluation of river water quality. - *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 34, 357-363.
- STURM, A. & HANSEN, P. D. (1999). Altered Cholinesterase and Monooxygenase Levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* Exposed to Environmental Pollutants. - *Ecotox. Environ. Safe.*, 42, 9-15.
- SUTCLIFFE, W.H.J. (1965). Growth estimates from ribonucleic acid content in some small animals. - *Limnology and Oceanography*, 10 (Suppl), R253- R258.
- SYMS, A. J., NORRIS, J. S., PANKO, W.B. & SMITH, R. G. (1985). Mechanism of androgen-receptor augmentation. Analysis of receptor synthesis and degradation by the density- shift technique. - *J. Biol. Chem.* 260: 455-61.
- T-
- TAVARES, R., LEMUS, M. & CHUNG, K. S. (2006). Evaluación del crecimiento instantáneo de juveniles de tiburón viuda virma (*Mustelus canis*) en su hábitat natural, a través del índice RNA/DNA. - *Ciencias Marinas*, 32 (2), 297-302.
- THIENEMANN, A. (1921). Seetypen. *Naturwissenschaften*, 9, 343-346.
- THIENEMANN, A. (1925). Die Binnengewässer Mitteleuropas: Eine Limnologische Einführung. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.
- THIENEMANN, A. (1954). *Chironomus*. Leben, Verbreitung und wirtschaftliche Bedeutung der Chironomiden. - *Binnengewässer*, 20, 1-834.

- THORNTON, K. & WILHM, J. (1974). The effects of pH, phenol, and sodium chloride on survival and caloric, lipid, and nitrogen content of a laboratory population of *Chironomus attenuatus* (Walk.). - *Hydrobiologia*, 45, 261-280.
- TIMMERMANS, K. R. & DAVIDS, C. (1989): Differences in trace metal concentration in chironomid larvae related to their feeding habit. - *Acta Biol. Debr. Oecol. Hung.*, 3, 361-365.
- TIMMERMANS, K. R. & WALKER, P. A. (1989). The fate of trace metals during the metamorphosis of chironomids (Diptera, Chironomidae). - *Environ. Pollut.*, 62, 73-85.
- TIMMERMANS, K. R., PEETERS, W. & TONKES, M. (1992). Cadmium, zinc, lead and copper in *Chironomus riparius* (Meigen) larvae (Diptera, Chironomidae): uptake and effects. - *Hydrobiologia*, 241, 119-134.
- TIMMERMANN, S.E. & BRIEGEL, H. (1999). Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes. - *J. Insect Physiol.*, 45, 461-470.
- TISSIÉRES, A., MITCHELL, H. K., & TRACY, U. M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. - *Journal of molecular biology*, 84(3), 389-398.
- TOKESHI, M. (1995). Species interactions and community structure. - *En: Armitage, P., Cranston, P. S. & Pinder, L. C. V. (Eds.). The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges.* Chapman & Hall, London. pp. 297-335.
- TONG, X. H., LIU, Q. H., XU, S. H., XIAO, Z. Z. & MA, D. Y. (2010). Changes in RNA, DNA, protein contents and growth of turbot *Scophthalmus maximus* larvae and juveniles. *Journal of Fish Biology*, 77: 512-525.
- TRAUNSPURGER, W. & DREWS, C. (1996). Toxicity analysis of freshwater and marine sediments with meio- and macrobenthic organisms: a review. - *Hydrobiologia*, 328, 215-261.

-U-

- URK, G. VAN, KERKUM, F. C. M. & WIERSMA, S. M. (1985). Bodemfauna in verontreinigde waterbodems. - *H2O*, 18, 509-513.
- URK, G. VAN & KERKUM, F. C. M. (1987). Chironomid mortality after the Sandoz accident and deformities in *Chironomus* larvae due to sediment pollution in the Rhine. - *Aqua*, 4, 191-196

-V-

- VAN DER OOST, R., GOKSARYR, A., CELANDER, M., HEIDA, H. & VERMEULEND, N. P. E. (1996). Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. - *Aquat. Toxicol.*, 36, 189-222.
- VAN HANDEL, E. (1965). Estimation of glycogen in small amounts of tissue. - *Anal. Biochem.*, 11, 256-265.
- VAN HANDEL, E. (1988). Nutrient accumulation in three mosquitoes during larval development and its effect on young adults. - *J. Am. Mosquito Contr.*, 4, 374-376.
- VERMEULEN, A. C. (1995). Elaborating chironomid deformities as bioindicators of toxic sediment stress: the potential application of mixture toxicity concepts. - *Ann. Zool. Fennici*, 32, 265-285.
- VERMEULEN, A. C., LIBERLOO, G., OLLEVIER, F. & GODDEERIS, B. (2000). Ontogenesis, transfer and repair of mouthpart deformities during moulting in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). - *Arch. Hydrobiol.*, 147(3), 401-415
- VIDAL, E. A. G., DIMARCO, P. & LEE, P. (2006). Effects of starvation and recovery on the survival, growth and RNA/DNA ratio in loliginid squid paralarvae. - *Aquaculture*, 260, 94-105.
- VILLARROEL, M. J., SANCHO, E., ANDREU- MOLINER, E. & FERRANDO, M. D. (2009). Biochemical stress response in tetradifon exposed *Daphnia magna* and its relationship to individual growth and reproduction. - *Sci. Total Environ.*, 407, 5537-5542.
- VINAGRE, A. S., AMARAL, A. P. N., RIBARCKI, F. P., SILVEIRA, E. F. & PÉRICO, E. (2007). Seasonal variation of energy metabolism in ghost crab *Ocypode quadrata* at Siriú Beach (Brazil). - *Comp. Biochem. Physiol. A*, 146, 514-519.
- VIRK, S. & KAUR, K. (1999). Impact of Mixture of Nickel and Chromium on the Protein Content of Flesh and Liver of *Cyprinus carpio* During Spawning and Post-Spawning Phases. - *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 499-502.
- VONTAS, J. G., ENAYATI, A. A., SMALL, G. J., & HEMINGWAY, J. (2000). A simple biochemical assay for glutathione S-transferase activity and its possible field application for screening glutathione S-transferase-based insecticide resistance. - *Pesticide biochemistry and physiology*,

68(3), 184-192.

VOS, J. H. (2001). *Feeding of detritivores in freshwater sediments*. - Tesis doctoral. Univ. Amsterdam, Holanda. 140 pp.

VREDE, T., PERSSON, J. & ARONSEN, G. (2002). The influence of food quality (P :C ratio) on RNA:DNA ratio and somatic growth rate of *Daphnia*. - *Limnol. Oceanogr.*, 47 (2), 487-494.

-W-

WAGNER, M., DURBIN, E. & BUCKLEY, L. (1998). RNA:DNA ratios as indicators of nutritional condition in the copepod *Calanus finmarchicus*. - *Marine Ecology Progress Series*, 162, 173-181.

WARWICK, W. F. (1985). Morphological abnormalities in Chironomidae (Diptera) larvae as measures of toxic stress in freshwater ecosystems: Indexing antennal deformities in *Chironomus* Meigen. - *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42, 1881-1914.

WARWICK, W. F. (1988). Morphological deformities in Chironomidae (Diptera) larvae as biological indicators of toxic stress. - *En Evans, M. S. (Ed.). Toxic contaminants and ecosystem health. A Great Lakes focus*. John Wiley and Sons, New York. pp. 281-320.

WARWICK, W. F. (1989). Morphological deformities in larvae of *Procladius skuse* (Diptera: Chironomidae) and their biomonitoring potential. - *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46. 1255-1270.

WARWICK, W. F. & TISDALE, N. A. (1988). Morphological deformities in *Chironomus*, *Cryptochironomus*, and *Procladius* larvae (Diptera: Chironomidae) from two differentially stressed sites in Tobin Lake, Saskatchewan. - *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45, 1123-1144.

WATLING, L. (1991). The sedimentary milieu and its consequences for resident organisms. - *Am. Zool.*, 31, 789-796.

WATTS, M. M. & PASCOE, D. (1996). Use of the freshwater macroinvertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) in the assessment of sediment toxicity. - *Wat. Sci. Tech.*, 34 (7-8), 101-107.

WATTS, M. M., PASCOE, D. & CARROLL, K. (2001). Chronic exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and bisphenol A-effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). - *Aquat. Toxicol.* 55, 113-24.

- WEBER, R. E., BRAUNITZER, G. & KLEINSCHMIDT, T. (1985). Functional multiplicity and structural correlations in the hemoglobin system of larvae of *Chironomus thummi thummi* (Insecta, Diptera): Hb components CTT I, CTT II, CTT IV, CTT VIIB, CTT IX and CTT X. - *Comp. Biochem. Physiol.*, 80B, 747-753.
- WEBER, L. P., HIGGINS, P. S., CARLSON, R. I. & JANZ, D. M. (2003). Development and validation of methods for measuring multiple biochemical indices of condition in juvenile fishes. - *J. Fish Biol.*, 63, 637-658.
- WENTSEL, R., MCINTOSH, A. & MCCAFFERTY, W. P. (1978). Emergence of the midge *Chironomus tentans* when exposed to heavy metal contaminated sediment. - *Hydrobiologia*, 57: 195-196.
- WESTERMAN, M.E. & HOLT, G. J. (1988). The RNA-DNA ratio: measurement of nucleic acids in larval *Sciaenops ocellatus*. - *Contributions in Marine Science*, 30, 117-124.
- WIEDERHOLM, T. (1980). Use of benthos in lake monitoring. - *J. Water Pollut. Contr. Fed.*, 52, 537-547.
- WIEDERHOLM, T. (1984). Incidence of deformed chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in Swedish lakes. - *Hydrobiologia*, 109, 243-249.
- WILSON, R. S. (1980). Classifying rivers using chironomid pupal exuviae. - *En Murray, D. A. (Ed.). Chironomidae: Ecology, Systematics, Cytology and Physiology*. Pergamon Press, Oxford. pp. 209-216.
- WILSON, R. S. & BRIGHT, P. L. (1973). The use of chironomid pupal exuviae for characterizing streams. - *Freshwat. Biol.*, 3, 283-302.
- WIPKING, W., VIEBAHN, M. & NEUMANN, D. (1995). Oxygen consumption, water, lipid and glycogen content of early and late diapause and non-diapause larvae of the burnet moth *Zygaena trifolii*. - *J. Insect Physiol.*, 41, 47-56.
- WINNER, R. W., BOESEL, M. W. & FARRELL, M. P. (1980). Insect community structure as an index of heavy metal pollution in lotic ecosystems. - *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37, 647-655.
- WHITESELL, L. & LINDQUIST, S. L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. - *Nat. Rev. Cancer* 5,761-72.
- WRIGHT, D. & MARTIN, F. (1985). The effect of starvation on RNA: DNA ratios and growth of larval striped bass, *Morone saxatilis*. - *Journal*

Fish Biology, 27, 479-485.

WÜLKER, W. & GÖTZ, P. (1968). Die Verwendung der imaginalscheiben zur bestimmung des entwicklungsstandes von *Chironomus*-larven (Dipt.). - Z. Morph., 62, 363-388.

WÜLKER, W., RÖSSLER, R. & VON ESSEN, S. (1979). Studies on the development of Imaginal Discs of *Chironomus* (Dipt.). The female Imaginal Disc in Abdominal Segment VIII. - Zool. Jb. Anat., 101, 136-153.

-Y-

YANKO, V., MUNA, A. & KAMINSKI, M. (1998). Morphological deformities of benthic foraminiferal tests in response to pollution by heavy metals: Implications for pollution monitoring. - J. Foram. Res., 28(3), 177-200.

YANG, J., MCCART, C., WOODS, D. J., TERHZA, S., GREENWOOD, K. G., FFRENCH-CONSTANT, R. H. (2007). A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism. - Physiol. Genomics 30, 223-31

YAO, T. P., FORMAN, B. M., JIANG, Z., CHERBAS, L., CHEN, J. D., MCKEOWN, M. (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. Nature 366, 476-9

YAO, T. P., SEGRAVES, W. A., ORO, A. E., MCKEOWN, M., EVANS, R. M. (1992). *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. - Cell 71, 63-72.

YI, X., DING, H., LU, Y., LIU, H., ZHANG, M. & JIANG, W. (2007). Effects of long-term alachlor exposure on hepatic antioxidant defense and detoxifying enzyme activities in crucian carp (*Carassius auratus*). - Chemosphere, 68, 1576-1581.

YOSHIMI, T., MINOWA, K., KAROUNA-RENIER, N. K., WATANABE, C., SUGAYA, Y., & MIURA, T. (2002). Activation of a stress-induced gene by insecticides in the midge, *Chironomus yoshimatsui*. - Journal of biochemical and molecular toxicology, 16(1), 10-17.

YUEN, W. K. & HO, J. W. (2001). Purification and characterization of multiple glutathione S-transferase isozymes from Chironomidae larvae. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 129, 631-40.

-Z-

- ZANDT, P. T. J. VAN DER, HEINIS, F. & KIKKERT, A. (1994). Effects of narcotic industrial pollutants on behaviour of midge larvae [*Chironomus riparius* (Meigen), Diptera]: a quantitative structure-activity relationship. - *Aquat. Toxicol.*, 28, 209-221.
- ZHANG, J., SHEN, H., WANG, X., WU, J., XUE, Y. (2004). Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. - *Chemosphere* 55, 167-174.
- ZHOU, B. S., WU, R. S. S., RANDALL, D. J., LAM, P. K.S. (2001). Bioenergetics and RNA/DNA relations in common carp (*Cyprinus carpio*) under hypoxia. - *J. Comp. Physiol. B* 171, 49-5.
- ZOU E, FINGERMAN M (1997). Effects of estrogenic xenobiotics on molting of the water flea, *Daphnia magna*. - *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38,281-5.

