

VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA



Departamento de Biología Celular, Biología
Funcional y Antropología Física

Programa de Doctorado en Contaminación, Toxicología y
Sanidad Ambientales

**Evaluación de los efectos producidos en
Daphnia magna tras la exposición al fungicida
procloraz y al insecticida piriproxifen**

TESIS DOCTORAL DIRIGIDA POR:

Dra. Encarnación Sancho Aguilar

Dra. M^a Dolores Ferrando Rodrigo

Dr. Francisco Javier Torres Gavilá

Beatriz Salesa Landete

Burjasot, Valencia

Julio, 2021

La Dra. Encarnación Sancho Aguilar, profesora del Departamento de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física de la Universitat de València, como Tutora y Directora, la Dra. M^a Dolores Ferrando Rodrigo, Profesora del Departamento de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física de la Universitat de València, y el Dr. Francisco Javier Torres Gavilá, Profesor del Departamento de Oceanografía y Medio Ambiente de la Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales de la Universidad Católica de Valencia, como directores.

Certifican:

Que la presente memoria titulada “Evaluación de los efectos producidos en *Daphnia magna* tras la exposición al fungicida procloraz y al insecticida piriproxifen”, ha sido realizada bajo nuestra dirección por Dña. BEATRIZ SALESA LANDETE, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado de Contaminación, Toxicología y Sanidad Ambientales.

Revisado el presente trabajo, consideramos que cumple los requisitos necesarios para ser presentado ante el Tribunal constituido al efecto, para la obtención del grado de Doctora, y para que así conste, expedimos el presente en Valencia, a 5 de julio de 2021.

Dra. Encarnación
Sancho Aguilar

Dra. M^a Dolores
Ferrando Rodrigo

Dr. Francisco Javier
Torres Gavilá

A mis directores Javier y M^{ra} Dolores, por acompañarme, aconsejarme y guiarme a lo largo de todo el trabajo. Pero especialmente a Encarna, no solo por todo lo anterior y por aguantarme, ilustrarme y "secarme" el cerebro, sino por estar ahí, por preguntarme, por escucharme, por ser mucho más que una tutora. Por tu cercanía, tu calidez y por todas las risas y experiencias que hemos compartido, gracias. Recorrer este camino a tu lado ha sido un verdadero placer, y aunque esta etapa llegue a su fin, espero que iniciemos juntas muchas más.

A mis más que compañeros de trabajo, mis amigos, mis "Cafelitos Chanchis": Samanta, Ana, Javi y Jorge. Aparecisteis en mi vida sin esperarlo, pero espero que jamás os vayáis de ella.

A Virginia, por todo lo que aprendí de ella antes de embarcarme en esta aventura y que tanto me ha servido. A Carmen, por estar ahí, siempre.

A Óscar, por su constante ayuda y apoyo, y por allanarme tanto el camino durante estos intensos años. Gracias por ponérmelo tan fácil.

Y por supuesto, a mi padre. Simplemente, gracias por todo.

*En esta vida no puedes controlarlo
todo, pero rodeándote de las personas
adecuadas, puedes afrontarlo todo.*

A mis padres

Índice

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	19
1.1	Ecotoxicología	26
1.2	Problemática de los plaguicidas Procloraz y Piriproxifen	34
1.2.1	Fungicida Procloraz.....	35
1.2.2	Insecticida Piriproxifen.....	37
1.3	Biología de <i>Daphnia magna</i>	40
1.3.1	Taxonomía y distribución geográfica	40
1.3.2	Morfología y fisiología	40
1.3.3	Ciclo reproductivo	43
2	OBJETIVOS.....	49
3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
3.1	Animales experimentales	55
3.1.1	Cultivo de <i>Daphnia magna</i>	55
3.1.2	Alimentación de <i>Daphnia magna</i> . Cultivo del alga clorofícea <i>Nannochloris oculata</i>	56
3.2	Plaguicidas	59
3.2.1	Fungicida procloraz.....	59
3.2.2	Insecticida piriproxifen	60
3.3	Ensayo de toxicidad aguda en <i>D. magna</i>	60

3.4	Efecto de los plaguicidas sobre el comportamiento alimenticio de <i>D. magna</i>	62
3.5	Ensayos de toxicidad crónica. Test de reproducción en <i>D. magna</i> (OECD 211)	65
3.5.1	Ensayo crónico en generación parental F0.....	65
3.5.2	Ensayo crónico en generación filial F1: ausencia vs presencia del plaguicida	71
3.6	Estudio para la determinación de alteraciones bioquímicas y genéticas tras la exposición crónica de <i>D. magna</i> a cada plaguicida	73
3.6.1	Exposición conjunta generación F0	73
3.6.2	Parámetros bioquímicos	74
3.6.2.1	Preparación de las muestras para los análisis bioquímicos...	75
3.6.2.2	Proteínas totales	75
3.6.2.3	Colesterol	76
3.6.2.4	Triglicéridos	77
3.6.2.5	Glucosa.....	78
3.6.2.6	Lactato.....	79
3.6.2.7	Lactato deshidrogenasa (LDH)	80
3.6.3	Expresión génica	81
3.6.3.1	Extracción ARN.....	81
3.6.3.2	Síntesis ADNc.....	82
3.6.3.3	Expresión de los genes	83
3.7	Análisis estadístico	86

4 RESULTADOS	89
4.1 Fungicida procloraz.....	91
4.1.1 Toxicidad aguda	91
4.1.2 Efecto sobre el comportamiento alimenticio.....	93
4.1.3 Toxicidad crónica.....	94
4.1.3.1 Exposición individual generación F0. Test de reproducción de <i>D. magna</i>	94
4.1.3.2 Exposición individual generación F1: ausencia vs presencia del plaguicida	101
4.1.3.3 Exposición conjunta generación F0	107
4.1.4 Parámetros bioquímicos	114
4.1.5 Expresión génica	118
4.1.5.1 Proteínas de choque térmico	118
4.1.5.2 Metabolismo de lípidos	118
4.1.5.3 Vitelogeninas.....	119
4.1.5.4 Estrés oxidativo	120
4.1.5.5 Metalotioneínas	120
4.1.5.6 Hemoglobina	121
4.1.6 Resumen resultados procloraz.....	122
4.2 Insecticida piriproxifen	124
4.2.1 Toxicidad aguda	124
4.2.2 Efecto sobre el comportamiento alimenticio.....	126
4.2.3 Toxicidad crónica.....	127

4.2.3.1	Exposición individual generación F0. Test de reproducción de <i>D. magna</i>	127
4.2.3.2	Exposición individual generación F1: ausencia vs presencia del plaguicida	138
4.2.3.3	Exposición conjunta generación F0.....	149
4.2.4	Parámetros bioquímicos	156
4.2.5	Expresión génica	159
4.2.5.1	Proteínas de choque térmico.....	159
4.2.5.2	Metabolismo de lípidos.....	160
4.2.5.3	Vitelogeninas	161
4.2.5.4	Estrés oxidativo	162
4.2.5.5	Metalotioneinas.....	163
4.2.5.6	Hemoglobina.....	164
4.2.6	Resumen resultados insecticida piriproxifen	165
5	DISCUSIÓN	167
5.1	Estudio de la toxicidad aguda.....	169
5.2	Efecto sobre el comportamiento alimenticio.....	173
5.3	Estudio de la toxicidad crónica	176
5.4	Efecto sobre la respuesta bioquímica	194
5.4.1	Efecto sobre el contenido proteico	194
5.4.2	Efecto sobre el metabolismo lipídico	196
5.4.3	Efecto sobre los niveles de glucosa y la ruta del lactato	198
5.5	Efecto sobre la expresión génica	201

5.5.2	Metabolismo de lípidos	202
5.5.3	Vitelogeninas.....	203
5.5.4	Estrés oxidativo	205
5.5.5	Metalotioneinas	206
5.5.6	Hemoglobina	207
6	CONCLUSIONES	211
7	BIBLIOGRAFÍA	217

1. Introducción

1 INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, los grandes avances tecnológicos y el rápido desarrollo de la investigación, han permitido no solo la producción de multitud de compuestos químicos que ayudan y facilitan el día a día al ser humano, sino también su detección a niveles traza en el medioambiente. Este amplio grupo de sustancias de nueva síntesis se engloban bajo el término de compuestos emergentes, que abarcan numerosos fines como la medicina, el cuidado personal, tensioactivos, plaguicidas, o aditivos industriales entre otros (Magi y Di Carro, 2016).

La presencia de este tipo de compuestos es cada vez más extensa en el entorno natural. Debido al transporte de largo alcance y a la acumulación a través de la cadena alimentaria se han llegado a detectar en áreas muy alejadas de su entorno de aplicación, llegando incluso a alcanzar regiones consideradas vírgenes como el Ártico o cadenas montañosas remotas (Devi *et al.*, 2015; Ademollo *et al.*, 2018). Aún bajo esta premisa, a día de hoy sigue existiendo un gran desconocimiento sobre sus repercusiones en el medioambiente y los seres vivos. Varias iniciativas promovidas tanto por la Organización Mundial de la Salud (2013) como por la Unión Europea (2016), junto a otras instituciones, tienen por objeto la estimación de los daños que puede causar su presencia en el medio natural (de Oliveira *et al.*, 2020). Es más, un panel de cientos de científicos internacionales ya ha advertido que estos avances han conllevado un elevado coste medioambiental en detrimento

de la calidad del suelo, el agua, el aire, la regulación climática y la preservación de los hábitats (Rosic *et al.*, 2020).

Uno de los grandes grupos perteneciente a esta clase de contaminantes emergentes es el de los plaguicidas. Su uso ha sido regulado a lo largo de años, y muchos de los empleados inicialmente, y altamente dañinos, tanto para el medioambiente como para el ser humano, han sido retirados del mercado. Es más, los usuarios son cada vez más conscientes de las medidas de precaución que deben tomar tanto para ellos mismos como para minimizar las repercusiones negativas y no diana en el entorno natural. Sin embargo, su uso racional conlleva necesariamente estudios asociados tanto de las formulaciones ya presentes en el mercado, como de los nuevos compuestos que se sintetizan en sustitución de los retirados. Solo obteniendo esta información, y preferiblemente de manera previa a su aplicación, será posible proceder de la forma más conveniente, tanto para tratar el problema inminente, como para evitar posibles afecciones futuras.

En la Figura 1 se representan porcentualmente englobados en 4 grupos los más de 400 productos fitosanitarios activos convencionales y categorizados como de bajo riesgo que podemos encontrar actualmente en España, incluidos en el Anexo A del Reglamento (CE) N.º 1107/2009 (actualización del 07 de mayo de 2021) “Lista comunitaria de sustancias activas aprobadas, excluidas y en evaluación comunitaria, sustancias de bajo riesgo, sustancias candidatas a la sustitución y lista de sustancias básicas”, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. En este listado, los fungicidas tienen la mayor representación con un 34.5 % (**150**

sustancias), seguidos por los herbicidas con un 27.6 % (*120 sustancias*), y los insecticidas con un 20 % (*87 sustancias*). De forma minoritaria están representados en el 18 % restante los fitorreguladores, molusquicidas, nematicidas, rodenticidas, topicidas, acaricidas, larvicidas, repelentes, atrayentes, fumigantes, desinfectantes, bactericidas y alguicidas.

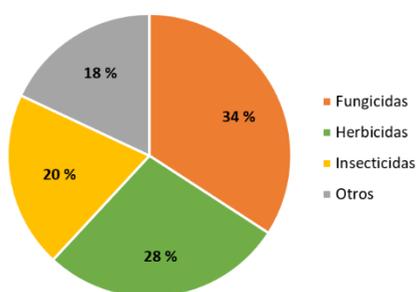


Figura 1.- Representación gráfica de las sustancias activas convencionales y de bajo riesgo incluidas en el Anexo A del Reglamento (CE) N.º 1107/2009 (actualización del 07 de mayo de 2021). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

A día de hoy, el uso de los compuestos plaguicidas sigue considerándose la forma más rentable para aumentar el rendimiento de los cultivos agrícolas, previniendo, minimizando y/o erradicando las plagas que los afectan (Rosic *et al.*, 2020). Más de un tercio de la superficie terrestre, y casi tres cuartas partes de los recursos hídricos dulceacuícolas se destinan a la producción agrícola y ganadera, convirtiéndose en una de las principales causas por las que llegan al medio natural. Así, Díez *et al.*, (2019) apelan a la necesidad de más estudios sobre su impacto en las vías fluviales locales.

El gran aumento que ha acontecido en la producción de alimentos, piensos, fibras y bioenergías en las últimas décadas ha permitido la prosperidad económica para muchos países, donde su empleo se ha traducido en un mejor rendimiento de las cosechas y en la disminución de enfermedades transmitidas por vectores. Pero no debe obviarse el hecho, pese a los beneficios obtenidos, de que el uso irracional y frecuente de esta clase de productos puede ocasionar efectos adversos sobre la salud humana y el medioambiente, bien por exposición directa o indirecta, aguda o crónica (Elvia *et al.*, 2000; González-Arias *et al.*, 2010).

Aunque los plaguicidas se aplican en grandes cantidades para evitar pérdidas en los cultivos, menos del uno por ciento llega a la plaga diana, de modo que gran parte del excedente acaba ingresando en los ecosistemas acuáticos a través de vías como los fenómenos de escorrentía o lixiviación (Racke, 2003). No obstante, su uso no se limita únicamente a estos ámbitos fitosanitarios: productos como los fungicidas se emplean de forma ubicua para tratar infecciones por hongos en la medicina humana y veterinaria (Corcoran *et al.*, 2010). Los insecticidas por otra parte, se utilizan en el ámbito doméstico para el control de plagas. Por ello, otra vía de acceso a las aguas superficiales es a través de los efluentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) (Carballa *et al.*, 2004; Gagné *et al.*, 2006).

De forma generalizada, los compuestos emergentes presentan moléculas cuyas propiedades fisicoquímicas dificultan su degradación, identificación y cuantificación: reducido tamaño molecular, ionización,

solubilidad en agua, lipofilia, polaridad o volatilidad (Bo *et al.*, 2016; Magi y Di Carro, 2016). La inmensa mayoría de las EDAR vigentes a día de hoy fueron diseñadas hace décadas y no se desarrollaron con la idea de retirar y destruir este tipo de compuestos, siendo su enfoque principal la eliminación orgánica y bacteriológica. Por ello, aunque se realice un tratamiento previo a su vertido, no es garantía de la ausencia de esta clase de compuestos (Bolong *et al.*, 2009).

En la actualidad, muchas de estas plantas incorporan procesos novedosos como la nanofiltración, que consigue reducir la presencia de contaminantes emergentes, aunque no su eliminación completa (Wang *et al.*, 2021). En definitiva, el medioambiente acuático recibe mezclas muy diversas de contaminantes de diferente naturaleza y por múltiples vías, entre ellos los plaguicidas.

Uno de los motivos principales que hace que resulte complicado controlar la presencia de plaguicidas en el entorno natural se deriva de la elevada movilidad que presentan. Existen compuestos con una elevada tasa de volatilidad que pasan a la atmósfera, otros llegan al medio acuático disueltos en el agua o adsorbidos en las partículas que contiene y son transportados por las corrientes, mientras que otros pueden permanecer acumulados en los sedimentos. De hecho, en multitud de ocasiones su aplicación se realiza directamente sobre un sistema acuático, como es el caso de acequias o lagunas, e incluso en cultivos inundados como los arrozales, con el fin de controlar las plagas de mosquitos que, aunque no dañen directamente a los cultivos, sí resultan un problema para la población de los municipios colindantes a este tipo

de explotaciones (Núñez-Torrent, 2014). De este modo, los seres vivos que habitan en los entornos afectados, sean o no diana, reciben elevadas concentraciones de estos compuestos al encontrarse en el propio foco de emisión. Aunque para la mayoría de ellos no supongan concentraciones letales, sí actúan en numerosas ocasiones como cantidades subletales pudiendo producir efectos crónicos en las poblaciones que conforman el ecosistema afectado, llegando a derivar en graves daños a largo plazo que resultan muy complejos tanto de prever como de evaluar. Bodar *et al.*, (1988) ya apuntaban cómo estos efectos adversos podían inducir alteraciones fisiológicas y poblacionales sobre la reproducción, el crecimiento o la supervivencia entre otros. Por otra parte, su elevada liposolubilidad, característica fisico-química presente en la mayoría de los plaguicidas, permitiría ser absorbidos por las membranas biológicas pudiendo llegar a acumularse en los depósitos grasos y atravesar las membranas celulares de los organismos no diana. Así, concentraciones subletales en los niveles más bajos de las cadenas tróficas podrían llegar a ser letales en los eslabones superiores, debido a los procesos de bioacumulación y biomagnificación (Skaare *et al.*, 2000).

1.1 Ecotoxicología

Sanz (1974), define la Ecotoxicología como “la ciencia responsable del estudio de los efectos negativos derivados de la contaminación, el origen, su evolución espacial y temporal, y las distintas interacciones que acontecen con organismos vivos de los ecosistemas implicados, teniendo como objetivo principal la protección del medio natural en relación a las sustancias nocivas que a él puedan acceder”. Calow (1993), ya abogaba

por la necesidad de anticipar qué entornos pueden verse afectados y tratar de minimizar su impacto negativo. Más tarde, la IUPAC (2009) redefine el término de Ecotoxicología como el estudio de los efectos tóxicos de los agentes tanto químicos como físicos sobre los organismos, especialmente en poblaciones y comunidades dentro del ecosistema, incluyendo las vías de transferencia de estos agentes y sus interacciones con el medioambiente (Nordberg *et al.*, 2009). Esta área científica ha evolucionado enormemente durante las últimas décadas, y el conocimiento que ha generado es cada vez más extenso, al igual que su interrelación con otras disciplinas científicas hacen que su valor y relevancia sean cada vez más evidentes.

Son múltiples las herramientas para evaluar la ecotoxicidad asociada con el uso de un determinado compuesto, y su elección estará directamente relacionada con el alcance buscado. Los ensayos agudos a corto plazo proporcionan una primera aproximación acerca de cómo el compuesto o grupo de compuestos puede impactar sobre una determinada especie, evaluando la tasa de supervivencia. Graney y Giesy (1986), ya abogaban por la realización de investigaciones a medio y largo plazo, pues permiten estudiar disfunciones en parámetros como el desarrollo y reproducción, crecimiento, bioquímica o fisiología de los individuos de una especie. Incluso podemos escalarlos a nivel poblacional, de comunidad o del ecosistema en su totalidad. Sin embargo, a día de hoy, realizar estudios de laboratorio que reflejen todas las interacciones que ocurren en la naturaleza sigue siendo muy complicado y costoso. Los bioensayos llevados a cabo en condiciones controladas se convierten en una herramienta muy útil y necesaria. Son

estudios realizados a corto y medio plazo encaminados a servir de base para la obtención de información sobre los posibles efectos nocivos de estos compuestos en individuos de una especie determinada, pudiendo utilizar los resultados para inferir qué posibles consecuencias tendría al trasladarlo a un ecosistema si estas condiciones se diesen en el entorno natural.

Mediante los estudios basados en toxicidad crónica, se puede estimar los efectos nocivos que el compuesto provocará sobre la especie objeto de estudio no diana a medio plazo. Se basan en la administración de concentraciones subletales de forma reiterada durante un tiempo que abarca de forma significativa gran parte de la vida del organismo. Por lo general, se realiza el seguimiento de una población procedente de una misma cohorte, expuesta a un único compuesto. Ello facilita la interpretación de resultados y aísla los efectos observados como procedentes única y exclusivamente del compuesto al que se exponen, pero dista mucho de lo que puede ocurrir en un escenario real. Si bien, no deben dejarse de lado otros factores importantes que no se reflejan de forma habitual en esta tipología de ensayos. Es muy complejo determinar las consecuencias de toda una amalgama de compuestos, y difícil reproducir las condiciones ambientales naturales en un entorno de laboratorio, entre otras; pero sí pueden incluirse otros factores que nos acerquen un poco más a la realidad del entorno natural. Uno de ellos es ampliar el periodo de exposición, y no limitarlo exclusivamente bien a una cohorte, bien a un periodo de desarrollo, teniendo en cuenta, por ejemplo, qué papel juega el tóxico en el proceso de la oogénesis y embriogénesis, o como transfiere la generación parental las afecciones o

resistencias a los descendientes tras la exposición (Baillieul *et al.*, 1993; Poulsen *et al.*, 2021).

Actualmente, el único requisito legal en los países miembros de la UE para evaluar los riesgos asociados a un plaguicida se basa en el estudio sobre una única generación de individuos, mediante la detección de concentraciones letales y en algunos casos, estudiando los efectos sobre el desarrollo y la reproducción (Reglamento (CE) No 1107/2009 del Parlamento Europeo). Esta clase de estudios no contemplan escenarios que se dan en la vida real, como la persistencia o aporte continuo de un plaguicida en el entorno exponiendo a varias generaciones sucesivas de una especie, o cómo repercuten las alteraciones producidas sobre la generación parental y que estos pueden trasladar a la descendencia aun habiéndose eliminado ya los contaminantes en el ecosistema que ocasionaron dichos desequilibrios (Poulsen *et al.*, 2021).

Al intentar seleccionar una especie entre todas las pertenecientes al ecosistema, o grupo de ellos, para evaluar los efectos negativos producidos en un medioambiente determinado, surge el concepto de organismo bioindicador. Según su definición, se trata de una especie que indica de forma clara, por su elevada sensibilidad, la presencia o ausencia de compuestos contaminantes, lo que permite evaluar el nivel de toxicidad de sustancias muy diversas a través de una fácil interpretación (Capó-Martín, 2007).

En los entornos acuáticos, la ecotoxicidad derivada de un plaguicida, históricamente se estudiaba principalmente sobre vertebrados (peces), por su impacto y envergadura no solo a nivel biológico, sino también

económico y social. Sin embargo, los estudios avalaron el empleo de otros grupos biológicos pertenecientes a niveles inferiores de la cadena trófica, no solo como estudios complementarios sino con entidad propia por diferentes causas (Hanazato, 1998; Abe *et al.*, 2001). Vertebrados e invertebrados pueden no verse afectados de manera negativa en la misma forma y grado debido a que cada grupo presenta unos mecanismos particulares de detoxificación. Sin embargo, los invertebrados acuáticos, generalmente, son más sensibles a estos compuestos que los vertebrados acuáticos. Asimismo, son más numerosos que éstos y constituyen un componente fundamental en el ecosistema, por lo que un descenso significativo en estas poblaciones podría traducirse en consecuencias negativas tanto a nivel ecológico como económico, por ejemplo, al verse mermadas las especies explotables en ambientes dulceacuícolas. Es importante enfatizar que incluso viéndose finalmente afectado la totalidad del ecosistema, será la comunidad zooplanctónica uno de los niveles tróficos que primero lo refleje, ya que pertenecen a la base de la misma. El zooplancton desempeña un papel vital en los ecosistemas acuáticos, de ahí que su modificación o alteración pueda acabar afectando a todos los niveles superiores (Lynch y Shapiro, 1981).

Dentro de la comunidad zooplanctónica de multitud de ecosistemas dulceacuícolas, encontramos el crustáceo cladóceros *Daphnia magna* Straus (1820). Es objeto de cientos de publicaciones científicas anuales, no únicamente por su relevancia en estudios de ecotoxicología, sino también en estudios evolutivos, fisiológicos y ecológicos (Lampert, 2011; Smirnov, 2017). Por otro lado, se usa extensamente en acuicultura

como alimento, principalmente, para crías de especies comerciales y peces ornamentales (Bekker *et al.*, 2018).

Para la ecotoxicología acuática, este animal se ha convertido en una herramienta imprescindible desde hace más de 3 décadas. Múltiples factores favorecen su uso como organismo bioindicador, y organizaciones como la *Environmental Protection Agency* (EPA) de Estados Unidos (EEUU), la Unión Europea (UE) o la *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD) lo consideran un estándar en los ensayos toxicológicos. Numerosas características lo señalan como organismo idóneo para llevar a cabo estos estudios. Como primer punto resaltar que su cultivo resulta muy económico en comparación con otras especies bioindicadoras de moluscos, macrocrustáceos o peces. Además, su ciclo vital y reproductivo relativamente cortos, y la producción de una descendencia genéticamente homogénea al presentar una reproducción partenogenética en entornos favorables, facilitan enormemente el establecimiento de relaciones causa-efecto de manera uniforme (Mark y Solbé, 1988). Se trata de una especie clave debido a su posición cerca de la base de la cadena trófica dentro de los ecosistemas que habita (consumidor primario), actuando como nexo entre los productores primarios y los depredadores en muchos de los sistemas dulceacuícolas (Hebert, 1978; Larsson y Dodson, 1993). Además, la característica más valiosa como organismo bioindicador es que presenta una elevada sensibilidad frente a multitud de contaminantes, especialmente a los plaguicidas (Baudo, 1987; Abe *et al.*, 2001).

Desde hace décadas la especie *D. magna* ha sido ampliamente usada tanto en los test de toxicidad aguda (I.S.O., 1982; U.S. E.P.A., 1983; Enserink *et al.*, 1990; Weyers *et al.*, 2000; Hernando *et al.*, 2003; Zvinavashe *et al.*, 2009; Horton *et al.*, 2018; Marzo *et al.*, 2020), como crónica (Fairchild *et al.*, 1992; Raby *et al.*, 2018; Oda *et al.*, 2019), para evaluar el efecto de compuestos tóxicos en el medio. La mayoría de estudios llevados a cabo hasta la última década se basaban principalmente en cambios fenotípicos, supervivencia, locomoción, alimentación o efectos sobre la reproducción (Seyoum *et al.*, 2019). Estos efectos estudiados de forma convencional pueden considerarse el resultado final del daño acumulado a nivel suborganísmico. Por ello, en los últimos años, la tipología de estudios se ha ido ampliando y diversificando: estudios multigeneracionales (Agatz *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2017), marcadores bioquímicos (Villarroel *et al.*, 2009; Gottardi y Cedergreen, 2019; Nkoom *et al.*, 2019; Siciliano *et al.*, 2019) o expresión génica (Zeis *et al.*, 2003; Seyoum *et al.*, 2019; Seyoum *et al.*, 2020), entre otros.

En los estudios ecotoxicológicos, la combinación de la información desde diferentes áreas de conocimiento, así como procedentes de diferentes niveles de organización biológica, proporcionan una mayor relevancia y una amplia perspectiva para la evaluación del impacto de factores tensionantes o estresantes de los ecosistemas acuáticos; tal y como recomiendan numerosos autores como Rodrigues *et al.*, (2017). Muchos autores anteriores y posteriores a Moore *et al.*, (2004) ya apuntaban a que la evolución favorable o desfavorable de la población sujeta a un estudio puede no reflejarse de forma cortoplacista, y solo

ahondando sobre distintos niveles de organización es posible obtener información sobre cómo evolucionará en el futuro si las condiciones de exposición se prolongan en el tiempo.

El ensayo más rápido que proporciona información relevante en esta especie es la prueba de toxicidad aguda, en la cual la inmovilidad se usa como criterio para evaluar la toxicidad de un compuesto. Son estudios a corto plazo y simples en su ejecución. Además, para la dafnia, el proceso de filtración e ingestión del alimento influye directamente en su fisiología en términos de crecimiento, metabolismo y reproducción. Ciertos compuestos tanto orgánicos como inorgánicos son capaces de alterar su comportamiento filtrador reduciendo la captación de alimento por los apéndices y por tanto, afectando a los procesos de ingesta y digestión, lo que podría traducirse en un debilitamiento del animal y hacerlo más vulnerable a los cambios que puedan acontecer en el medio en el que vive (Orchard *et al.*, 2002). Realizar por tanto ensayos sobre el comportamiento alimenticio en individuos neonatos de esta especie pueden resultar muy informativos, pudiendo evaluar en un tiempo reducido (desde unas pocas horas a varios días) las posibles alteraciones derivadas de la exposición de un contaminante. Sin embargo, ninguno de estos ensayos tiene en cuenta posibles impactos en la capacidad reproductiva. En condiciones normales, el buen estado de la población depende de la esperanza de vida, el tiempo hasta la madurez reproductiva y la tasa de reproducción, parámetros fundamentales en investigaciones ecotoxicológicas (Walthall y Strack, 1997). Por ello resulta de gran interés ampliar la información con otra modalidad de ensayos, ya que, aunque a través de los experimentos crónicos estándar, donde los

individuos neonatos se exponen a concentraciones subletales del compuesto abarcando varias semanas del ciclo de vida, podamos incrementar la información obtenida, no debemos descartar otros tipos de análisis que complementen la información obtenida.

En los individuos de *D. magna* se puede observar su respuesta frente a los contaminantes ambientales y factores estresantes mediante el seguimiento de los niveles en determinados marcadores bioquímicos, o los perfiles de expresión génica como resultado de una exposición tanto directa como indirecta a estos compuestos (Steinberg *et al.*, 2008). Se ha demostrado que resultan herramientas eficientes para el control de la toxicidad debido a su sensibilidad, velocidad y precisión (Seyoum *et al.*, 2019). Pueden ayudar a mejorar la comprensión de los procesos involucrados en la exposición a factores ambientales estresantes, como cambios en los parámetros físico-químicos del medio, o la presencia de contaminantes entre otros, ya que reflejan alteraciones relacionadas con el metabolismo energético u otros criterios de valoración individuales como la reproducción o el crecimiento, así como la viabilidad tanto individual como poblacional (Sokolova *et al.*, 2012). También se utilizan como indicadores de alerta temprana de contaminación ambiental y sus efectos posteriores, ya que estos marcadores pueden verse alterados a bajas concentraciones de exposición (Coelho *et al.*, 2011). Por ello resulta de gran utilidad ampliar la evaluación de parámetros poblacionales, con el estudio a otros niveles de organización intraespecíficos y subindividuales mediante biomarcadores, al poner de manifiesto alteraciones cuantificables de procesos biológicos (nivel

molecular, celular, bioquímico, fisiológico), como consecuencia de la exposición a un tóxico (Van der Oost *et al.*, 2003).

1.2 Problemática de los plaguicidas Procloraz y Piriproxifen

En este trabajo se han seleccionado dos plaguicidas ampliamente usados actualmente en la Unión Europea, con el fin de evaluar los posibles efectos negativos causados en individuos de la especie *D. magna*, organismo presente en los ecosistemas dulceacuícolas sobre los que directamente se emplean estos compuestos, o a los que llegan grandes cantidades de los mismos a través de diferentes vías.

1.2.1 Fungicida Procloraz

Se trata de un fungicida de tipo imidazol empleado principalmente en agricultura con actividad preventiva, aunque también puede actuar en la curación y erradicación de plagas de hongos. No es propiamente un fungicida sistémico, pero muestra cierta acción translaminar, por lo que es capaz de penetrar parcialmente en la planta a través del follaje o las raíces y moverse por ella. Los productos comercializados, por lo general, se formulan como complejo de manganeso a pH ácido que le proporciona estabilidad. Están indicados para el control de forma directa de hongos, especialmente ascomicetos y deuteromicetos, en variedad de cultivos: arroz, melón, remolacha, espinacas, cereales, ... Aunque también se emplea durante el almacenamiento de la cosecha (Gómez-Hernández, 2008).

Los fungicidas azoles están diseñados para bloquear el crecimiento de los hongos al inhibir la síntesis del citocromo (CYP) P450 (Gottardi y

Cedergreen, 2019). Concretamente procloraz tiene un mecanismo de acción centrado principalmente en la inhibición de la síntesis de la enzima CYP51. Esta enzima participa en la biosíntesis del ergosterol, componente esencial de la membrana celular de los hongos que le proporciona integridad, e interviene tanto en el correcto funcionamiento de múltiples enzimas como en la división celular (Henry y Sisler, 1984). Actúa al unirse el grupo azol a la enzima. El nitrógeno nucleofílico ubicado en la parte media del azol se une al hierro de la enzima responsable de transformar el lanosterol en ergosterol e impide su correcta síntesis (Henry y Sisler, 1984; Copping y Hewitt, 1998).

El gran grupo de enzimas monooxigenasas del citocromo P450 también juegan un papel fundamental en la catalización de una amplia variedad de reacciones oxidativas, y en las rutas de detoxificación por medio de la biotransformación en organismos no diana (Rösch, 2016). Gottardi *et al.*, (2017), demostraron que procloraz era capaz de inhibir la actividad del citocromo P450 en neonatos *D. magna* tras exponerlos al fungicida durante 48 horas. Se ha apuntado que procloraz actúa de manera no selectiva inhibiendo la aromatasas (CYP19) (Sanderson *et al.*, 2002), además de actuar como antagonista sobre la actividad de receptores androgénicos como el receptor de estrógeno en ensayos *in vitro* con células humanas (Andersen *et al.*, 2002). Estudios realizados sobre el efecto producido por el procloraz sobre el pez cebra evidenciaron que a concentraciones altas (202 µg/L) actuaba sobre la especie como disruptor endocrino agonista, ya que encontraron una mayor proporción de machos e individuos intersex, además de alteraciones gonadales junto con una reducción de los niveles de

vitelogenina tanto en machos como en hembras. Sin embargo, a concentraciones bajas (16-64 $\mu\text{g/L}$), producía un aumento significativo de la vitelogenina en los individuos macho, evidenciando que procloraz es un disruptor endocrino con múltiples modos de acción (Kinnberg *et al.*, 2007).

Su presencia en el medio ambiente está bastante extendida. Varios estudios llevados a cabo en ríos españoles con el fin de analizar el contenido en plaguicidas, han puesto de manifiesto su presencia en las aguas corrientes. Masiá *et al.*, (2015), encontraron concentraciones de procloraz de hasta 9.87 ng/L en el río Llobregat (Barcelona), y Ccancapa *et al.*, (2016a), determinaron su presencia a concentraciones de hasta 486 ng/L en un estudio en los ríos Turia (Teruel) y Júcar (Cuenca).

1.2.2 Insecticida Piriproxifen

Piriproxifen es un insecticida utilizado actualmente por numerosos países para el control de plagas en cultivos agrícolas como el algodón, naranja, almendros, manzanos, o café entre otros (Sullivan y Goh, 2008). También se emplea en áreas interiores para el control de plagas domésticas como la cucaracha alemana (Saltzmann *et al.*, 2006) o la mosca común (Biale *et al.*, 2017), y se comercializa para uso tópico en gatos y perros para el control profiláctico de pulgas (Stanneck *et al.*, 2002). Sin embargo, uno de sus usos más extendidos es para el control de plagas de mosquitos como las especies *Anopheles arabiensis* (Lwetoijera *et al.*, 2014), *Anopheles gambiae* (Jaffer *et al.*, 2015), *Culex quinquefasciatus* (Jambulingam *et al.*, 2008), *Aedes albopictus* (Suman

et al., 2018) o *Aedes aegypti* (Tsunoda *et al.*, 2013), insectos que mediante su picadura transmiten enfermedades como la malaria, filariasis, fiebre amarilla, dengue o chikungunya respectivamente. Este compuesto es utilizado en todo el mundo en programas de salud pública como alternativa a los pesticidas organofosforados y piretroides, pues debido a su uso extensivo han acabado generando resistencias sobre las poblaciones de insectos diana en varias regiones del planeta (Lima *et al.*, 2011). Se emplea para el control de múltiples plagas tanto en fuentes de agua potable como en masas de agua, a concentraciones de hasta 10 y 100 $\mu\text{g/L}$ respectivamente (Lajmanovich *et al.*, 2019). Numerosos estudios demuestran que este insecticida se encuentra presente en gran cantidad de masas de agua fluviales (Campo *et al.*, 2013; Masiá *et al.*, 2015; Ccanccapa *et al.*, 2016a). Concentraciones de hasta 37.74 ng/L se han citado en el río Ebro (Ccanccapa *et al.*, 2016b), y de 99.59 ng/L (equivalente al 1% respecto a la concentración determinada como concentración segura para el agua potable por la Organización Mundial de la Salud establecida en 10 $\mu\text{g/L}$, 2007) en el río Júcar (Moura y Souza-Santos, 2020).

Se trata de un agonista de la hormona juvenil, ya que su fórmula estructural es similar a ésta, aunque mucho más estable, por lo que compite activamente por sus receptores (Sullivan y Goh, 2008). En condiciones naturales, el insecto deja de sintetizar esta hormona para dar paso al estado adulto mediante la metamorfosis. En presencia de análogos, al seguir éstos uniéndose a los receptores de la hormona juvenil, impide la interrupción del proceso imposibilitando el paso de fase larvaria a pupa, alterando su desarrollo natural y, por tanto,

imposibilitando su metamorfosis a estadio adulto (Dhadialla *et al.*, 1998).

El efecto que piriproxifen produce en insectos es más variado. Se ha citado entre otros su capacidad de: impedir la eclosión de los huevos (Ohba *et al.*, 2013), afectar al desarrollo larvario (Wang *et al.*, 2013), o promover aberraciones morfológicas y reducir la fecundidad en adultos (Maoz *et al.*, 2017). Debido a ello se ha clasificado también como disruptor endocrino (Sullivan y Goh, 2008).

En otros taxones no se conoce con certeza su modo de acción, pero existen evidencias de su efecto en el desarrollo de vertebrados acuáticos provocando un aumento de la mortalidad a dosis reducidas (Dzieciolowska *et al.*, 2017; Azevedo- Linhares *et al.*, 2018), malformaciones, y una potenciación de su efecto cuando se asocia a microcistina, toxina producida por cianobacterias en ambientes acuáticos eutróficos (Azevedo-Linhares *et al.*, 2018). Multitud de estudios han demostrado que las concentraciones efectivas empleadas para el control de plagas de mosquitos producen efectos adversos en otros organismos terrestres como abejas melíferas, u organismos acuáticos invertebrados (anfípodos, cangrejos, dafnias), y vertebrados (pez cebra), tanto en embriones como adultos (Truong *et al.*, 2016; Lawler (2017); Azevedo-Linhares *et al.*, 2018; Maharajan *et al.*, 2018; Maharajan *et al.*, 2020).

1.3 Biología de *Daphnia magna*

1.3.1 Taxonomía y distribución geográfica

El organismo modelo seleccionado en este estudio como bioindicador, *Daphnia magna*, es una especie perteneciente al subfilo Crustacea, clase Branchiopoda, orden Diplostraca, superorden Cladocera, familia Daphniidae (WoRMS, 2021).

D. magna es una especie cosmopolita. Los primeros estudios sobre su distribución geográfica se centraron en Europa (De Gelas y De Meester, 2005; Fields *et al.*, 2015), aunque esta especie también es común en el Medio Oriente, Asia Central, varias regiones de Siberia Oriental y Occidental, China, África del Norte, África del Sur, y América del Norte (Brooks, 1957; Benzie, 2005). Se distribuye generalmente en regiones con clima árido, en zonas situadas a baja y media altura sobre el nivel del mar. A pesar de que los individuos de esta especie son capaces de tolerar un amplio rango de condiciones ambientales, con mayor éxito se localizan en pequeños remanentes de agua como charcas o zanjas inundadas con un bajo nivel de turbidez y alta radiación solar. En entornos acuáticos de abundante vegetación pueden encontrarse en masas más grandes formando enjambres (Alonso, 1996). Generalmente quedará excluida de entornos como lagos tropicales donde la ictiofauna ejerce una intensa depredación sobre la especie (Brooks, 1957).

1.3.2 Morfología y fisiología

Daphnia magna (Figura 2) es un pequeño crustáceo con una longitud máxima en hembras de 6 mm y en machos de 3 mm (sin contar la espina

caudal), presenta un patrón variable de coloración entre pardo y anaranjado, en función, de forma asilada o conjunta, de la salinidad y el oxígeno disuelto en el medio acuático (Alonso, 1996). La disponibilidad de alimento en el medioambiente influye directamente en su tamaño: en situaciones de escasez primará la supervivencia y el crecimiento. Las hembras tenderán a producir una descendencia poco numerosa con individuos relativamente grandes, mientras que, en condiciones óptimas, las camadas serán mucho más grandes con individuos más pequeños (Mc Kee y Ebert, 1996). El crecimiento del individuo está ligado a la generación de una nueva muda, no solo durante su desarrollo hasta el estadio adulto, sino también tras cada camada.

Morfológicamente, dafnia presenta un caparazón bivalvo, encontrándose comprimido lateralmente al menos de forma parcial. En el caso de las hembras, cada valva presenta simetría central, mientras que en el macho es asimétrica, formando la parte superior un ángulo aproximado de 90°. El tronco está protegido por el caparazón, quedando fuera tanto el cefalón como la espina caudal.

En el cefalón se ubican las antenas primarias o anténulas (elongadas en los machos), con función sensorial, y las antenas secundarias. Estas últimas las emplea para para generar un movimiento principalmente vertical y a impulsos, permitiéndole la natación. Mediante su batido, el individuo se impulsa hacia arriba hundiéndose posteriormente de forma paulatina, pues a su vez las usa de amortiguador al descender en la columna de agua. (Ebert, 2005)

La capacidad de visión en el género *Daphnia*, es otorgada por un único ojo compuesto de coloración oscura, situado en la región antero-medial del cefalón, como resultado de la fusión de ambos ojos al inicio del segundo estadio de desarrollo embrionario (Sobral *et al.*, 2001). Presenta fototactismo positivo, lo que le permite orientarse en el proceso de natación gracias a la detección de los cambios de luminosidad en el entorno (Ebert, 2005).

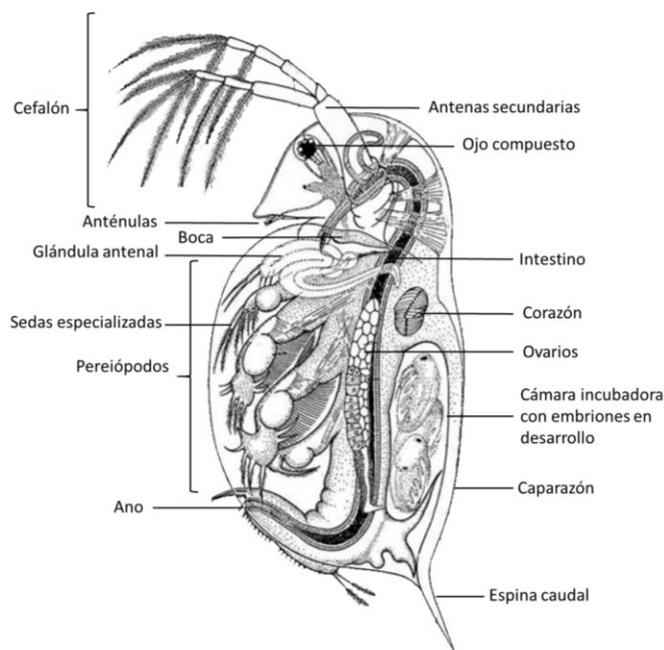


Figura 2.- Morfología y anatomía interna en género *Daphnia*. Fuente: Modificado de Ebert (2005).

El cuerpo está compuesto por cinco pares de apéndices troncales (pereiópodos). Aunque en su conjunto la dafnia los emplea para generar una corriente de agua, la finalidad del tercer al quinto par es la filtración, destinando los apéndices primero y segundo para retirar el poso

provocado por los residuos de la filtración (Nieto y Mier, 1985). Presenta un tipo de alimentación suspensívora, ya que al generar la corriente es capaz de filtrar las microalgas presentes en el medio, y mediante las sedas especializadas situadas en la parte inferior de los apéndices, las recolecta y transfiere al surco alimentario. Este organismo solo es capaz de filtrar partículas de un tamaño entre 1 y 35 μm (Geller y Müller, 1981).

El órgano excretor se encuentra en las glándulas antenales (Ebert, 2005). La dafnia regula el equilibrio osmótico mediante absorción activa más que a través de la dieta. En este proceso se ponen en práctica tres estrategias reguladoras para el mantenimiento del equilibrio iónico. La primera mediante la dilución de la hemolinfa, lo que se traduce en una minimización de la tasa del flujo osmótico (Waterman, 1961). En segundo lugar, a través de la absorción activa de cloruros que permite reincorporar sales perdidas desde los sacos branquiales, mediante una fina cutícula ubicada en la base de los apéndices torácicos. Y finalmente, por medio de las glándulas antenales y en determinados casos a través de la superficie general corporal, mediante la excreción de los productos nitrogenados como el amoníaco (Thorp y Covich, 1991).

1.3.3 Ciclo reproductivo

Existen dos tipos de reproducción en el ciclo de los dáfnidos con alternancia generacional, resumidos en la Figura 4.

Partenogénesis: en condiciones medioambientales óptimas (abundancia de recursos alimenticios, y con densidad

poblacional baja), la población estará conformada exclusivamente por hembras. Una vez éstas alcanzan la madurez reproductiva, generan huevos diploides. Los huevos pasan del ovario a la cámara dorsal de incubación donde se desarrollan, pudiendo incluso llegar a albergar embriones en tres estadios diferentes de desarrollo. En el interior de los ovarios tiene lugar la producción de oocitos y la vitelogénesis en algunos de estos oocitos, y en la cámara incubadora se encuentran los embriones en proceso de desarrollo (Zaffagnini, 1987).

En la Figura 3 puede verse la cámara incubadora en hembras adultas en diferentes fases de la reproducción partenogenética. El desarrollo embrionario es directo, y se da por finalizado cuando los neonatos son expulsados al exterior abandonando la cámara de incubación que se encuentra ubicada justo debajo del caparazón. Este proceso va acompañado del desprendimiento del exoesqueleto, generando una nueva muda. Los individuos expulsados al exterior están provistos de capacidad natatoria para desplazarse en la columna de agua y alimentarse (Sobral *et al.*, 2001).

Una vez liberados, el crecimiento de los neonatos continúa con dos o tres estadios de intermuda, sucedidos por aproximadamente cinco estados pre-reproductivos más, previos a la liberación de la primera camada una vez alcanzada la

madurez reproductiva (habitualmente tiene lugar entre el sexto y noveno día de vida).

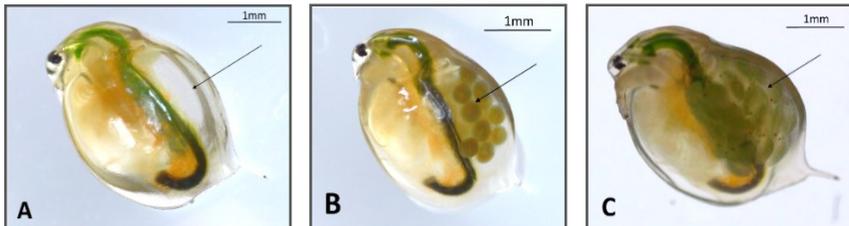


Figura 3.- Estado de la cámara incubadora en hembras adultas de *D. magna* en diferentes fases durante la reproducción partenogenética. **A:** cámara incubadora vacía. **B:** cámara con embriones en estadio temprano de desarrollo. **C:** cámara con embriones completamente desarrollados y próximos a su liberación al exterior como neonatos. Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico, aumentos 30x.

En condiciones óptimas y con una alimentación correcta, las hembras pueden llegar a producir más de 65 neonatos en cada una de las camadas, aunque por término medio, suelen estar compuestas por 12 individuos, produciendo a lo largo de su vida entre 17 y 20 camadas. El tamaño medio de la camada variará en función de los factores medioambientales, los recursos alimenticios, y la propia edad de la hembra. La máxima puesta suele encontrarse en torno a la quinta, momento a partir del cual decrece nuevamente debido al proceso de envejecimiento de la progenitora (Hallam *et al.*, 1990). En la Figura 4 se muestra el ciclo reproductivo de la dafnia en condiciones ambientales favorables (reproducción partenogenética) y desfavorables (reproducción sexual).

Reproducción sexual (Figura 4): las poblaciones de dáfnidos en el medio natural se encuentran integradas de forma prácticamente exclusiva por hembras gran parte del año. La aparición de machos tiene lugar cuando las condiciones ambientales se tornan adversas. Generalmente derivan de una elevada densidad poblacional, lo que implica un aumento en la acumulación de productos de desecho (resultando en una elevación de la toxicidad para la población), y una reducción en la disponibilidad de alimentos, aunque su aparición puede ser resultado de otros factores como un déficit de oxígeno, o cambios bruscos de las temperaturas. La presencia de machos en estas condiciones conlleva que la hembra produzca solo dos huevos haploides en cada puesta, uno por ovario, que serán fecundados por el macho al introducir a través de las valvas del caparazón de la hembra su postabdómen, depositando el esperma en el interior de la cámara incubadora. Una vez los huevos son fecundados, se produce un engrosamiento de las paredes de la cámara incubadora convirtiéndose en cápsulas de protección con forma de estribo conocidas como efípias o quistes de resistencia, lo que supone una menor inversión metabólica en la reproducción por parte de los parentales. Las efípias son capaces de soportar la congelación y desecación, incluso la digestión si es ingerida por organismos como peces, aves o mamíferos. De esta forma, la especie es capaz de salvar grandes distancias además de superar condiciones adversas como las sequías estivales o las heladas invernales. Tras un

periodo de diapausa, cuando las condiciones ambientales vuelven a ser favorables, eclosionan liberando hembras partenogénicas que restituyen la población (Thorp y Covich, 1991).

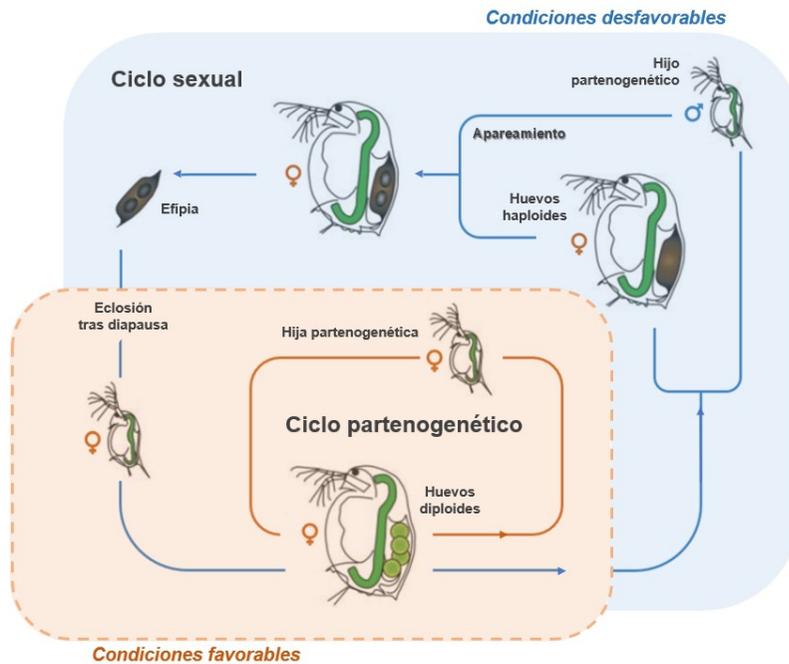


Figura 4.- Ciclo reproductivo de *Daphnia magna*. En color naranja se muestra el ciclo partenogénico durante condiciones medioambientales favorables. En color azul, el ciclo sexual con la aparición de machos ante condiciones desfavorables y la formación de huevos haploides que serán fecundados por éstos dando lugar a 2 huevos diploides protegidos en las efípias. Fuente: Modificado de Ebert, 2005.

2. Objetivos

1 OBJETIVOS

Los objetivos que se pretenden alcanzar en este estudio son:

1. Evaluar la toxicidad aguda del crustáceo *Daphnia magna* frente a cada uno de los plaguicidas de estudio, procloraz y piriproxifen, para el establecimiento de la CE₅₀ y selección de concentraciones subletales para el resto de ensayos.
2. Determinar si los plaguicidas estudiados provocan alteraciones en el comportamiento alimenticio de neonatos de *D. magna* evaluando las tasas de filtración e ingestión, tras exponerlos a las concentraciones subletales que posteriormente se emplearán en los ensayos de toxicidad crónica.
3. Estudiar los efectos producidos a largo plazo por los plaguicidas procloraz y piriproxifen empleando para ello las mismas fracciones de sus respectivas CE₅₀ a 48 horas, siguiendo las recomendaciones de la OECD 211 para evaluar los parámetros de supervivencia, reproducción y crecimiento individual en *Daphnia magna*. Así como las posibles alteraciones morfológicas o de pigmentación.
4. Evaluar la existencia de recuperación y/o efectos adversos en la generación filial (F1) de individuos de *D. magna* procedentes de parentales (F0) expuestos a la concentración más elevada

testada de cada uno de los plaguicidas, tras permitir el desarrollo en medio exento de plaguicida durante 21 días.

5. Evaluar la existencia de efectos adversos en la generación filial (F1) de individuos de *D. magna* procedentes de parentales (F0) expuestos a la concentración más elevada de cada plaguicida, provocados por la exposición de la generación F1 a las mismas condiciones que sus progenitoras durante 21 días.

6. Determinar la presencia de alteraciones fisiológicas en los individuos expuestos de *D. magna* durante 21 días a concentraciones subletales de cada plaguicida mediante marcadores bioquímicos.

7. Determinar la existencia de cambios en la expresión génica ligada a distintas rutas biológicas como consecuencia de la exposición a concentraciones subletales durante 21 días de individuos de *D. magna* a cada uno de los plaguicidas objeto de estudio.

3. Material y Métodos

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Animales experimentales

3.1.1 Cultivo de *Daphnia magna*

El presente estudio se ha llevado a cabo utilizando individuos pertenecientes a la especie *Daphnia magna*, clon K6 (Muysen y Janssen, 2001), cuya colonia se mantiene de forma permanente en el Laboratorio de Ecotoxicología y Calidad Ambiental (LEyCA) en el departamento de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física de la Universitat de València, según las recomendaciones de la OECD (2004). Los animales se mantienen en acuarios de 5 litros de capacidad con una densidad de 30 individuos por acuario y cuyo medio de cultivo se renueva semanalmente. Para ello se emplea agua de la red de suministro municipal, previamente declorada mediante aireación, y con una saturación en oxígeno superior al 90 %. Cada dos días los acuarios se filtran para eliminar los neonatos, manteniendo solo a las hembras reproductoras.

El crecimiento, la reproducción y la supervivencia de los invertebrados acuáticos están muy influenciados por las posibles variaciones de los distintos factores medioambientales (Buikema *et al.*, 1980). La Tabla 1 muestra las características físico-químicas del medio de cultivo de *D. magna* en nuestro laboratorio. Todos los valores se encuentran dentro de las recomendaciones establecidas por la OECD. El mantenimiento constante de todos los parámetros en el cultivo de la colonia garantiza su mantenimiento óptimo. Ello conlleva la no

inferencia en los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad realizados. Los acuarios de la colonia se ubican en una cámara climatizada con fotoperiodo, aireación y temperatura controlados. Su alimentación se realiza con algas clorofíceas unicelulares (*Nannochloris oculata*).

Tabla 1.- Condiciones físico-químicas del medio de cultivo de *Daphnia magna* en el LEyCA de la Universitat de València.

Propiedad	Valor
Dureza total	210 ± 10 mg/L de CaCO ₃
pH	7.9 ± 0.2
Alcalinidad	4.1 mmol/L
Oxígeno disuelto	>90 % saturación
Temperatura	22 ± 1 °C
Fotoperiodo	16:8 horas (luz/oscuridad)

3.1.2 Alimentación de *Daphnia magna*. Cultivo del alga clorofícea *Nannochloris oculata*

N. oculata es un alga clorofícea unicelular que se cultiva de forma continua en el LEyCA (Figura 5). Su tamaño celular está comprendido entre 1.5 - 2.0 µm (Yúfera *et al.*, 1983) lo que permite que pueda ser ingerida por las dafnias. El género *Nannochloris* posee un único cloroplasto ocupando gran parte de la célula semiesférica. Es inmóvil, desprovista de flagelos y con crecimiento vegetativo por fisión binaria.

Según Lubian (1979), las características del crecimiento poblacional de *N. oculata* son:

1. Carencia de fase de latencia apreciable, siempre y cuando el inóculo utilizado para la resiembra sea de un volumen adecuado y se mantengan en las mismas condiciones que el cultivo.
2. Fase de aceleración con la que comienza el crecimiento y que discurre dentro de las primeras 24 horas.
3. Fase de crecimiento exponencial entre 3 y 6 días de duración.
4. Fase de desaceleración, en la cual durante varios días la población sigue aumentando paulatinamente.
5. Fase estacionaria.

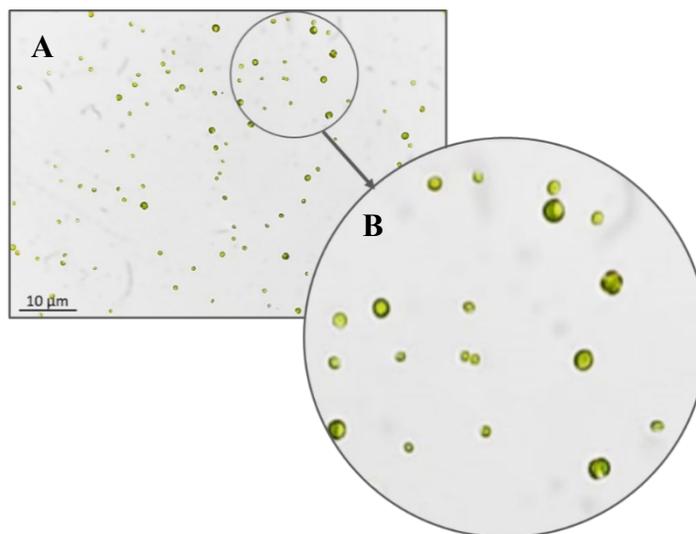


Figura 5.- Imagen A: células vistas al microscopio binocular (400x). Imagen B: ampliación de imagen para mejorar la visualización de las células de *N. oculata* procedentes del cultivo continuo del LEyCA de la Universitat de València.

El inóculo inicial puro procede del “Institute of Freshwater Ecology. The Windermere Laboratory” (Laboratory for Biological Research in

Aquatic Pollution, Universidad de Gante, Bélgica). Su mantenimiento se lleva a cabo en la cámara climatizada del LEyCA. Para su cultivo, siguiendo las recomendaciones de Bischoff y Bold (1963), se emplea un medio compuesto por un 10 % de solución BBM, y suplementado con 0.2 % de solución de vitaminas y 0.2 % de solución de metales esenciales, por litro de agua destilada, reflejado en la Tabla 2.

Tabla 2.- Composición de las soluciones de BBM, metales y vitaminas para el cultivo de *Nannochloris oculata* en el LEyCA de la Universitat de València.

Solución	Compuesto	Cantidad
Medio BBM	NaNO ₃	2500 mg/L
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	250 mg/L
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	750 mg/L
	K ₂ HPO ₄	750 mg/L
	KH ₂ PO ₄	1750 mg/L
	NaCl	250 mg/L
Metales	NaFe-EDTA	5 g/L
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	180 mg/L
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	10 mg/L
	ZnSO ₄ · 6H ₂ O	10 mg/L
	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	6.4 mg/L
Vitaminas	Tiamina	200 mg/L
	Biotina	10 mg/L
	B ₁₂	10 mg/L

Fuente: Bischoff y Bold (1963)

El cultivo se mantiene en suspensión mediante una columna de aire a la temperatura constante de la cámara (22 °C), proporcionando energía lumínica de potencia no inferior a 2000 luxes y fotoperiodo constante de

24 horas. El cultivo en el laboratorio siempre se retira en la fase de crecimiento exponencial, y se conserva refrigerado y en oscuridad hasta su uso. Se renueva semanalmente mediante resiembras en medio fresco contenido en recipientes de vidrio de 3 litros de capacidad.

El alimento fresco *N. oculata* se suministra a la colonia de dafnias tres veces por semana a una concentración de alga de $5 - 10 \cdot 10^5$ células/mL. Concentración de alga óptima recomendada por la bibliografía (Allen *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1998), y verificada por los estudios llevados a cabo por el laboratorio LEyCA.

3.2 Plaguicidas

3.2.1 Fungicida procloraz

El producto técnico (pureza > 99.9 %) fue suministrado por la empresa Sigma-Aldrich (número de registro CAS 67747-09-5), con fórmula molecular $C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$, y peso molecular 376.67 g/mol. El nombre químico es *N*-propil-*N*-[2-(2,4,6-triclorofenoxi)etil]imidazol-1-carboxamida (Figura 6).

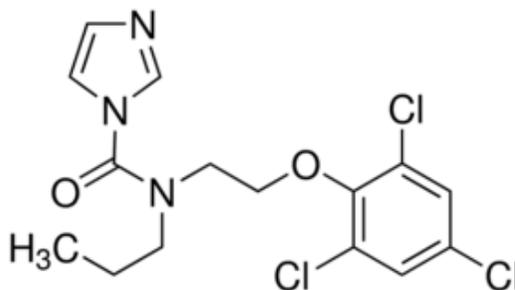


Figura 6.- Fórmula estructural del fungicida procloraz. Fuente: www.sigmaaldrich.com

3.2.2 Insecticida piriproxifen

El producto técnico fue suministrado por la empresa Plant Protection Company S.L (PROPLAN, España), número CAS 95737-68-1, (> 97 %). Su fórmula molecular es $C_{20}H_{19}NO_3$, y su peso molecular 321.37 g/mol. El nombre químico es 4-fenoxifenil (RS)-2-(2-piridiloxi)propil éter (Figura 7).

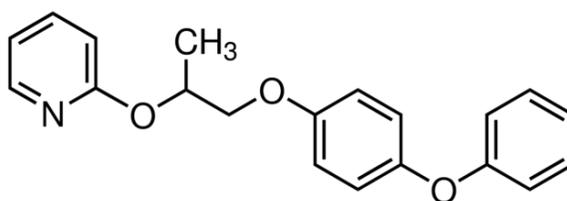


Figura 7.- Fórmula estructural del insecticida piriproxifen. Fuente: www.sigmaaldrich.com

3.3 Ensayo de toxicidad aguda en *D. magna*

Para estudiar la toxicidad aguda de los compuestos seleccionados, se llevaron a cabo ensayos de inmovilización en *D. magna*, siguiendo las recomendaciones de la OECD “*Guideline for Testing of Chemicals, Daphnia sp., Acute Immobilisation Test*” (2004).

El objetivo del ensayo fue determinar la concentración de tóxico necesaria para producir la inmovilización del 50 % de la población objeto de estudio durante 24 y 48 horas, conocida como Concentración Efectiva 50 (CE₅₀).

Para determinar la CE_{50} definitiva en las condiciones propias del LEyCA, se llevaron a cabo ensayos preliminares con el fin de establecer un rango de concentraciones apropiado para su cálculo. Finalmente se seleccionaron las concentraciones indicadas a continuación para llevar a cabo los ensayos de toxicidad aguda tanto a 24 como a 48 horas:

- Procloraz: 8, 9, 10, 11 y 12 mg/L
- Piriproxifen: 50, 150, 260, 440, 780 y 1000 $\mu\text{g/L}$

Los ensayos se llevaron a cabo frente a un grupo control exento de plaguicida, y el respectivo grupo control con cada uno de los solventes empleados (acetona en el caso de procloraz, y etanol en el piriproxifen) con un rango de validez que no debía exceder el 10 % de inmovilización.

Se emplearon individuos neonatos (≤ 24 horas), de modo que 24 horas previas al experimento, los cultivos de *D. magna* fueron filtrados con el fin de retirar los juveniles preservando solo a adultas reproductoras. Empleando la misma agua que para la colonia, se preparó una solución stock del plaguicida. A partir de esta solución, se obtuvieron las disoluciones de ensayo. Para ello, se usaron recipientes de vidrio de 30 mL de capacidad con 25 mL de medio para cada una de las concentraciones por triplicado. Mediante pipetas tipo Pasteur de 3 mL, se introdujeron 10 neonatos en cada uno de los recipientes, y se añadió una pequeña cantidad de alcohol cetílico en forma de pequeñas lentejas que quedan en suspensión en el agua, inocuo para *D. magna* pero que permite disminuir la tensión superficial del agua, impidiendo que los neonatos puedan quedar retenidos en la superficie y, como consecuencia, causar su muerte interfiriendo en los resultados del experimento (Cotou, 1993).

Los ensayos se mantuvieron en el interior de la cámara climatizada. Durante los experimentos de toxicidad aguda los dáfidos no fueron alimentados y no se renovó el medio (condiciones estáticas), según las ya citadas recomendaciones.

A las 24 y 48 horas se determinó y registró para cada una de las concentraciones la inmovilización de los individuos. El criterio seguido fue: ausencia de movimiento al menos durante 15 segundos tras ligera agitación del recipiente (OECD, 2004).

3.4 Efecto de los plaguicidas sobre el comportamiento alimenticio de *D. magna*

Los ensayos para evaluar el efecto de los plaguicidas sobre el comportamiento alimenticio en *D. magna* se realizaron siguiendo la metodología descrita por Ferrando *et al.*, (1993), quienes llevaron a cabo estudios con la finalidad de definir las condiciones más propicias en cuanto a densidad poblacional, tiempo de exposición al tóxico y concentración del alimento en el medio (alga), entre otros.

Basándose en los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda, se seleccionaron para cada uno de los plaguicidas 5 concentraciones subletales (Tabla 3), correspondientes a las fracciones 1/107, 1/71, 1/55, 1/40 y 1/24 de sus respectivas CE_{50} a 48 h. En todos los casos se incluyó un control de animales exento de plaguicida. No se incluyeron controles con disolvente ya que previos experimentos realizados en nuestro laboratorio (Sancho *et al.*, 2009) y apoyados por la bibliografía, pusieron de manifiesto que las concentraciones finales empleadas tanto de acetona (22 μ L/L) en el caso de procloraz, como de

etanol (0.28 $\mu\text{L/L}$) en el piriproxifen, no afectan a los parámetros analizados (Hannas *et al.*, 2011).

Tabla 3.- Concentraciones finales ensayadas en los estudios del comportamiento alimenticio en *D. magna* a 5 horas, para cada uno de los plaguicidas.

Compuesto	Concentraciones ($\mu\text{g/L}$)
Procloraz	87, 130, 170, 230 y 380
Piriproxifen	3.14, 4.74, 6.12, 8.41 y 14.02

Para ello, se seleccionaron individuos de menos de 24 horas de vida, según el procedimiento descrito anteriormente (apartado 3.3). Los experimentos se realizaron en recipientes de vidrio de 30 mL de capacidad, conteniendo 25 mL de medio fresco. Para cada uno de los plaguicidas, y su correspondiente batería de concentraciones más un grupo control exento de plaguicida, se realizaron 3 réplicas, colocando 10 neonatos en cada recipiente de vidrio. Los animales fueron alimentados con el alga *N. oculata* a una concentración inicial de $5 \cdot 10^5$ células/mL. Todos los experimentos se llevaron a cabo en oscuridad durante un periodo de 5 horas a 22 ± 1 °C.

Tras las 5 horas de ensayo, se determinó la concentración de alga final mediante recuento en cámara cuentaglóbulos Neubauer.

Con los datos obtenidos se calcularon los parámetros:

- **Tasa de filtración (F):** volumen medio filtrado por individuo y unidad de tiempo ($\mu\text{L/ind/h}$).
- **Tasa de ingestión (I):** número de células consumidas por individuo y unidad de tiempo (cel/ind/h).

Los cálculos se realizaron mediante las ecuaciones (Gauld, 1951):

$$F = \frac{V}{n} \cdot \frac{(\ln C_0 - \ln C_t)}{t} - A$$

$$A = \frac{\ln C_0 - \ln C'_t}{t}$$

$$I = F \cdot \sqrt{C_0 \cdot C_t}$$

Donde:

C₀: concentración de alga inicial (células/mL)

C_t: concentración de alga final (células/mL)

t: tiempo de duración del experimento (5 horas)

n: número de individuos

V: volumen de líquido del medio en μL

A: factor de corrección que hace referencia a los cambios producidos en la concentración de alga inicial C_0 en ausencia de animales tras haber transcurrido el tiempo t . C'_t es la concentración de alga final del experimento (células/mL)

3.5 Ensayos de toxicidad crónica. Test de reproducción en *D. magna* (OECD 211)

3.5.1 Ensayo crónico en generación parental F0

El esquema general seguido para llevar a cabo los ensayos crónicos de toxicidad con individuos de la especie *D. magna* se describe a continuación siguiendo las indicaciones de la OECD 211 (2012).

Los organismos empleados fueron neonatos (< 24 h) procedentes del cultivo, siguiendo el mismo protocolo detallado en el apartado 3.3, y empleando las mismas concentraciones subletales especificadas en el apartado 3.4.

Las disoluciones de los compuestos plaguicidas se prepararon en matraces aforados de vidrio (de 1 L de capacidad) justo antes de realizar las renovaciones del medio, a partir de una disolución inicial de 20 mg/L. La solución madre se renovó cada 3 días. Estudios previos estimaron mediante HPLC que en ese intervalo de tiempo no se producía degradación significativa de los compuestos ensayados (Hassold y Backhaus, 2014).

El experimento, para cada concentración de plaguicida y su control, se compuso de 15 dafnias dispuestas de manera individual en recipientes de vidrio de 60 mL de capacidad con 50 mL de medio.

De forma diaria se renovó el medio y se trasvasaron las dafnias a recipientes limpios con la ayuda de la pipeta. La transferencia de los individuos de un recipiente a otro se realizó con precaución para evitar cualquier daño físico producido por su manipulación.

Una vez las hembras adquirieron la madurez sexual y a partir de la primera cohorte, tras cambiar al individuo de recipiente se llevó un registro del número de neonatos que integraron cada una de las camadas.

Neonatos procedentes de la tercera camada en el caso del procloraz, y segunda en el del piriproxifen, fueron reservados para llevar a cabo el ensayo crónico de la generación F1 (apartado 3.5.2). A partir de este momento, tras el recuento, los neonatos fueron recolectados, almacenados por día y concentración, y preservados en etanol para su posterior análisis morfológico bajo el microscopio estereoscópico. Para el estudio morfológico se escogieron al azar un mínimo de 50 individuos por día y condición, siempre que fue posible. Cuando la morfología del individuo lo permitía, se determinó el sexo del mismo, según las pautas indicadas por la OECD 211 (elongación del primer par antenal en los machos), y se evaluaron las malformaciones cuando las hubo. La determinación de las malformaciones se basó en estudios previos realizados por LeBlanc *et al.*, (2000), Palma *et al.*, (2009), Wang *et al.*, (2011) y Hassold *et al.*, (2014). Para ello, se observaron principalmente alteraciones en:

- Desarrollo: individuos en estadios previos a un neonato completamente formado o con morfología anómala.
 - Espina caudal: no extendida completamente, plegada o morfología anómala.
 - Ojo: ojos sin fusionar o ausencia de ojo.
 - Caparazón: no recubriendo el tronco, valvas desplegadas u otras deformaciones de las mismas.
 - Antenas secundarias: subdesarrolladas o anómalas.
-

El alimento fue proporcionado diariamente junto a la renovación de medio, a una concentración de alga de 5×10^5 células/mL.

Durante los 21 días que duró el ensayo se realizó el seguimiento de los parámetros individuales: capacidad reproductiva, supervivencia y crecimiento (al finalizar el test: día 21), así como el parámetro poblacional tasa intrínseca de incremento natural (r). Van Leeuwen *et al.*, (1985), demostraron que existía una correlación superior al 99% entre el valor obtenido de r durante los primeros 21 días de vida de *D. magna* y el valor correspondiente al mismo parámetro calculado para el ciclo de vida completo, resaltando la elevada importancia de la reproducción temprana para el establecimiento del crecimiento poblacional. Es por ello que el test de tres semanas (21-d) se considera apropiado para el cálculo de la tasa intrínseca de crecimiento natural en una población de esta especie. La utilización de r en los estudios toxicológicos como parámetro demográfico ha sido ampliamente recomendada (Allan y Daniels, 1982), debido a que su estadística se basa no solo en la supervivencia de los individuos de la población expuesta, sino también en su fecundidad.

El crecimiento individual fue evaluado al finalizar el ensayo registrando la longitud corporal (LC), midiendo el caparazón desde la parte anterior del rostro hasta la base de la espina caudal (Fernández-Casalderrey *et al.*, 1995; Ferrando *et al.*, 1996), como se refleja en la Figura 8.

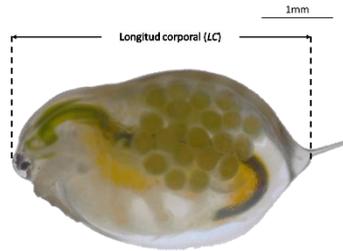


Figura 8.- Medida de la longitud de *D. magna*. Fotografía tomada con microscopio estereoscópico, aumentos 30x.

Además de esta medición (LC , recomendada por la OECD), también se registraron la longitud de la espina caudal (Seyoum *et al.*, 2020), el ancho del individuo, y el largo y ancho de la cámara incubadora según se observa en la Figura 9. Con estos datos se establecieron las siguientes relaciones:

$$\text{Proporción Espina Caudal} = \frac{Lec}{LC + Lec} * 100$$

$$\text{Proporción cámara incubadora} = \frac{Aci * Lci}{AC * LC} * 100$$

Donde:

Lec : Longitud espina caudal

LC : Longitud corporal

AC : Anchura corporal

Aci : Anchura cámara incubadora

Lci : Longitud cámara incubadora

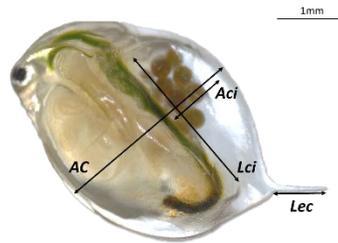


Figura 9.- Medida de la anchura corporal (AC), longitud de la espina caudal (*Lec*), anchura de la cámara incubadora (*Aci*) y longitud de la cámara incubadora (*Lci*) en *D. magna*. Fotografía tomada con microscopio estereoscópico, aumentos 30x.

La medición *Lec* se realizó desde su unión ventral al caparazón, hasta su extremo distal. Las medidas de longitud y anchura de la cámara incubadora se realizaron tomando el tubo digestivo como delimitación. El eje de medida de *Lci* se trazó de forma paralela a éste, y el eje *Aci* como la perpendicular mayor desde el tubo digestivo hasta la parte dorsal interior de la cámara incubadora. En ambos casos la finalidad fue determinar si el tamaño tanto de la espina caudal como de la cámara incubadora se veían alterados de forma no proporcional al aumento o disminución del tamaño individual de la dafnia.

Debido a que la espina caudal es muy sensible a la manipulación y puede romperse con facilidad, solo se contemplaron aquellas dafnias en las que se comprobó su integridad en el microscopio estereoscópico.

Para el registro de las distintas mediciones se procedió a fotografiar a todas las dafnias empleando microscopía estereoscópica con cámara incorporada Leica modelo S9i (software Leica Application Suites V4.12.0). Cada individuo se colocó en una placa Petri, retirando el exceso de humedad con papel secante para conseguir su inmovilización. Tras obtener la imagen, el animal se trasvasó en seco a un tubo de microcentrífuga previamente etiquetado, y fue congelado

(inmediatamente en nitrógeno líquido) y almacenado en un ultracongelador de -80 °C Froilabo (modelo BMT 690), hasta su posterior análisis. Cada imagen obtenida se analizó empleando el software ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

La supervivencia (días) de los animales se evaluó de forma diaria en el momento del trasvase de las dafnias de ensayo a los recipientes con medio fresco.

Los parámetros empleados para evaluar la capacidad reproductiva de las dafnias fueron:

- **Tiempo a la primera puesta**, o tiempo de maduración reproductiva (días): es el tiempo que transcurre entre el inicio del ensayo y la liberación de la primera camada.
- **Número de camadas por hembra**: número medio de camadas de descendientes generadas por hembra durante el ensayo.
- **Tamaño medio de la camada**: número medio de neonatos que integran las camadas de descendientes por hembra.
- **Número total de neonatos por hembra**: número total de descendientes producidos por cada hembra durante los 21 días de duración del ensayo.

El parámetro poblacional tasa intrínseca de crecimiento natural (r) se calculó mediante la fórmula de Lotka (1913):

$$\sum l_x \cdot m_x \cdot e^{-r} = 1$$

r : tasa intrínseca de crecimiento natural

l_x : supervivencia (número de individuos vivos / total)

m_x : reproducción (número total de descendientes / número de hembras)

x : edad (días transcurridos desde el inicio del experimento)

3.5.2 Ensayo crónico en generación filial F1: ausencia vs presencia del plaguicida

De forma paralela a la realización del ensayo crónico individual en la generación F0 (3.5.1), se emplearon individuos pertenecientes a la tercera camada en el caso del procloraz y la segunda en el caso del piriproxifen (debido a los resultados observados en los parámetros reproductivos de la generación F0 expuesta a piriproxifen). La finalidad del ensayo fue evaluar la capacidad de recuperación o efectos adversos producidos en los individuos expuestos desde su nacimiento a la concentración más elevada de cada uno de los plaguicidas (considerada como la condición más desfavorable). Tras el recuento, se separaron 30 individuos de los grupos tratados (que posteriormente se dividirían en 2 subgrupos de 15 individuos). Se procedió a realizar un segundo ensayo crónico individual, siguiendo las mismas pautas y realizando los mismos registros como se detalló en el apartado 3.5.1.

En todos los casos, se mezclaron los neonatos correspondientes a la misma cohorte y condición de exposición, disponiéndose de forma aleatoria e individual en los frascos de vidrio para realizar el ensayo.

En el primer grupo experimental se mantuvieron las condiciones de partida. Se continuó con la exposición al tóxico a la misma concentración del medio de la que procedían (380 µg/L en el caso del procloraz, y 14.02 µg/L en el caso del piriproxifen). Este grupo se designó como “TT” (tratado/tratado), al ser hijos procedentes de madres expuestas. En el segundo grupo se dispusieron los neonatos procedentes de madres tratadas, en medio exento de plaguicida. Este grupo se designó como “TL” (tratado/libre de plaguicida).

Para ambos plaguicidas se reservaron neonatos procedentes de las hembras control del mismo día en el que se recolectaron los de madres tratadas con el tóxico, para hacer de control interno en cada uno de los ensayos de la generación F1.

Una vez alcanzada la madurez reproductiva de las hembras, los neonatos procedentes del ensayo, tras su recuento, se recolectaron y preservaron en etanol absoluto para su posterior análisis en el microscopio estereoscópico con el fin de determinar el sexo y detectar la existencia de malformaciones, según el procedimiento del apartado 3.5.1.

3.6 Estudio para la determinación de alteraciones bioquímicas y genéticas tras la exposición crónica de *D. magna* a cada plaguicida

3.6.1 Exposición conjunta generación F0

Para realizar este estudio, los animales se dispusieron en recipientes de vidrio de 3 litros de capacidad (uno por cada concentración de tóxico mas el grupo control). En cada uno de ellos se dispensaron 2 litros de solución de plaguicida a cada una de las concentraciones testadas en el ensayo crónico (apartado 3.5.1). El número de neonatos empleados al inicio del ensayo fue de 40 en cada frasco experimental, manteniendo la proporción de 50 mL por individuo. No se incluyeron controles con los solventes ya que según la bibliografía las concentraciones finales empleadas en el presente trabajo no afectan a los parámetros de estudio (Soetaert *et al*, 2007; Ha y Choi, 2009; Jansen *et al*, 2013; Jeong *et al*, 2013; Wuerz *et al*, 2019).

Aunque la finalidad de realizar el tratamiento en estas condiciones fue obtener suficiente biomasa para poder estudiar los parámetros bioquímicos y la expresión génica, también se realizó un registro diario de los parámetros reproductivos y supervivencia para cada una de las condiciones ensayadas durante la renovación del medio y alimento. La supervivencia fue registrada diariamente, y los neonatos retenidos en el proceso de filtración de los medios para conservar solo las madres en el experimento, fueron recolectados y preservados en etanol para su posterior recuento y estudio morfológico (determinación del sexo y presencia de malformaciones).

Finalizados los 21 días de duración de la exposición al plaguicida, las hembras fueron fotografiadas (apartado 3.5.1) y congeladas en seco en nitrógeno líquido de forma individual, y preservados a -80 °C.

3.6.2 Parámetros bioquímicos

Debido a que los parámetros bioquímicos son altamente sensibles a las concentraciones subletales de numerosos agentes estresantes, pero a menudo su respuesta es específica del agente en cuestión (Sancho *et al.*, 2009), se optó por seleccionar rutas generales implicadas en el metabolismo energético de la dafnia: proteínas, lípidos, glucosa, y ruta del lactato. Estas biomoléculas son esenciales para el correcto desarrollo de los individuos, y alteraciones en sus concentraciones pueden ser debidas al estrés provocado por encontrarse en presencia de un agente contaminante (De Coen y Janssen, 2003).

Mientras que las reservas de lípidos se metabolizan cuando la disposición de alimento se ve reducida en el entorno, las reservas proteicas solo se catabolizan bajo ausencia severa o completa del mismo (Elendt, 1989). Por otro lado, la respuesta básica del metabolismo intermedio ante factores de estrés parece derivar en una movilización y utilización de las reservas de carbohidratos, aportando la energía necesaria para garantizar el correcto funcionamiento de diferentes rutas anabólicas del organismo (De Coen *et al.*, 2001).

La determinación de los parámetros bioquímicos se llevó a cabo mediante protocolos adaptados a microplaca de 96 pocillos adaptando los volúmenes de cada protocolo indicados por el fabricante, y las lecturas se realizaron con un espectrofotómetro de microplaca modelo

Varioskan™ LUX (ThermoScientific™). Los resultados fueron normalizados al contenido en proteínas totales de cada muestra y se expresaron finalmente como concentración por individuo.

3.6.2.1 Preparación de las muestras para los análisis bioquímicos

Para cada concentración y tóxico ensayado, se realizaron 6 réplicas formadas por dos individuos procedentes de cada una de las condiciones ensayadas. Se dispusieron en tubos de microcentrífuga (1.5 mL de capacidad), se añadieron 30 μ L de tampón fosfato (pH 7.2) y se homogeneizaron sobre hielo picado, con la ayuda de un pistilo. Posteriormente se centrifugaron (6 minutos, 3500 rpm), y el sobrenadante se trasvasó a un tubo limpio preservado en hielo para su uso inmediato. Todas las reacciones tuvieron lugar a temperatura ambiente (25 °C).

3.6.2.2 Proteínas totales

El contenido proteico se determinó mediante el ensayo Bradford (1976) empleando el reactivo *Bradford Protein Assay* (Biorad). Para la curva patrón se empleó albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich).

Se tomaron 3 μ L de muestra y se añadieron 100 μ L de reactivo Bradford. Las muestras se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente (25 °C) y posteriormente se realizó la lectura en el espectrofotómetro de microplaca a una longitud de onda (λ) de 595 nm. Los datos obtenidos se interpolaron en la curva patrón para obtener los valores de concentración de proteínas en cada una de las muestras analizadas.

3.6.2.3 Colesterol

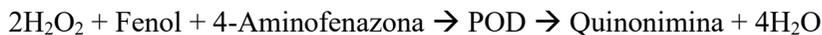
Para la determinación de colesterol total, se empleó el kit de la casa comercial SPINREACT (Ref: 1001090) “*Determinación cuantitativa de colesterol CHOD-POD. Enzimático colorimétrico*”.

La disposición de los reactivos en la placa multipocillo fue la siguiente:

- Blanco: reactivos (250 μ L)
- Patrón: reactivos (250 μ L) + patrón primario acuoso de Colesterol 200 mg/dL (2.5 μ L)
- Muestras: reactivos (250 μ L) + muestra (2.5 μ L sin diluir)

Las muestras se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente, y la lectura se realizó a una $\lambda = 505$ nm.

El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción:



Para la determinación de la concentración de colesterol que había presente en cada muestra se empleó la fórmula (establecida en el protocolo):

$$\frac{(A)\text{Muestra} - (A)\text{Blanco}}{(A)\text{Patrón} - (A)\text{Blanco}} \cdot 200 \text{ (Conc. Patrón)} = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ de colesterol en la muestra}$$

3.6.2.4 Triglicéridos

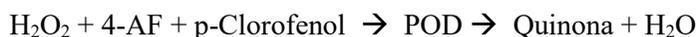
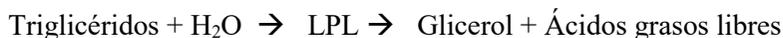
Los niveles de triglicéridos se determinaron empleando el kit de la casa comercial SPINREACT (Ref: 1001310) “*Determinación cuantitativa de triglicéridos GPO-POD. Enzimático colorimétrico*”.

La disposición de los reactivos en la placa multipocillo fue:

- Blanco: reactivos (250 μL)
- Patrón: reactivos (250 μL) + patrón primario acuoso de Triglicéridos 200 mg/dL (2.5 μL)
- Muestras: reactivos (250 μL) + muestra (2.5 μL sin diluir)

Las muestras se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente, y la lectura se realizó a una $\lambda = 505 \text{ nm}$.

Los triglicéridos presentes en la muestra originan un compuesto coloreado según la siguiente reacción:



Para la determinación de la concentración de triglicéridos presente en cada muestra se empleó la fórmula dada en el protocolo del kit empleado:

$$\frac{(A)\text{Muestra} - (A)\text{Blanco}}{(A)\text{Patrón} - (A)\text{Blanco}} \cdot 200 \text{ (Conc. Patrón)} = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ de triglicéridos en la muestra}$$

3.6.2.5 Glucosa

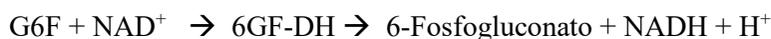
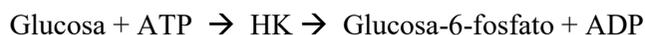
Para la determinación de la concentración de glucosa, se empleó el kit de la casa comercial SPINREACT (Ref: 1001200) “*Determinación cuantitativa de glucosa. Hexokinasa. Enzimático – UV.*”

La disposición de los reactivos en la placa multipocillo fue la siguiente:

- Blanco: reactivos (250 μ L)
- Patrón: reactivos (250 μ L) + patrón primario acuoso de Glucosa 100 mg/dL (2.5 μ L)
- Muestras: reactivos (250 μ L) + muestra (2.5 μ L sin diluir)

Las muestras se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente, y la lectura se realizó a una $\lambda = 340$ nm.

La glucosa presente en la muestra origina un compuesto detectable en el espectro ultravioleta según la siguiente reacción:



Para la determinación de la concentración de glucosa presente en cada muestra se aplicó la fórmula indicada en el protocolo del kit empleado:

$$\frac{(\text{A})\text{Muestra} - (\text{A})\text{Blanco}}{(\text{A})\text{Patrón} - (\text{A})\text{Blanco}} \cdot 100 (\text{Conc. Patrón}) = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ de glucosa en la muestra}$$

3.6.2.6 Lactato

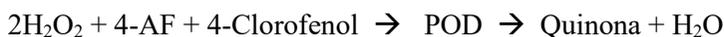
Para realizar la medición de lactato, se empleó el kit de la casa comercial SPINREACT “*Determinación cuantitativa de lactato. LO-POD. Enzimático colorimétrico*”. (Ref: 1001330).

La disposición de los reactivos en la placa multipocillo fue la siguiente:

- Blanco: reactivos (250 μL)
- Patrón: reactivos (250 μL) + patrón primario acuoso de lactato 10 mg/dL (2.5 μL)
- Muestras: reactivos (250 μL) + muestra (2.5 μL sin diluir)

Las muestras se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente, y la lectura se realizó a una $\lambda = 505 \text{ nm}$.

El lactato presente en la muestra origina un compuesto coloreado:



Para la determinación de la concentración de glucosa presente en cada muestra se empleó la fórmula indicada en el protocolo del kit empleado:

$$\frac{(A)\text{Muestra} - (A)\text{Blanco}}{(A)\text{Patrón} - (A)\text{Blanco}} \cdot 10 (\text{Conc. Patrón}) = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ de lactato en la muestra}$$

3.6.2.7 Lactato deshidrogenasa (LDH)

La actividad LDH se determinó mediante el kit de la casa comercial SPINREACT “*Determinación cuantitativa de lactato deshidrogenasa. Piruvato. Cinética UV. DGKC*”. (Ref: 1001260).

La disposición de los reactivos en la placa multipocillo fue la siguiente:

- Blanco: reactivos (300 μ L)
- Muestras: reactivos (300 μ L) + muestra (3 μ L sin diluir)

Se realizó una lectura inicial de la muestra, y posteriormente cada minuto durante 3 minutos, $\lambda = 340$ nm y temperatura ambiente.

La LDH presente en la muestra origina un compuesto detectable en el espectro ultravioleta según la siguiente reacción:



Para la determinación de la concentración de glucosa presente en cada muestra se empleó la fórmula indicada en el protocolo del kit empleado:

$$\frac{\Delta A}{\text{min}} \cdot 4925 = \frac{\text{U}}{\text{L}} \text{ LDH en la muestra}$$

Siendo “U” la cantidad de enzima que convierte 1 μ mol de substrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración por tanto se expresa en unidades por litro.

3.6.3 Expresión génica

La elección de los genes objeto de estudio se realizó en función de la estimación de los posibles efectos producidos por ambos plaguicidas de forma general en las dafnias expuestas. Se escogieron genes implicados en rutas de detoxificación de xenobióticos (síntesis de metalotioneinas), respuesta a factores estresantes (síntesis de proteínas de choque térmico), estrés oxidativo (glutación-S-transferasa y catalasa), factores reproductivos (vitelogeninas), mecanismo de regulación de ácidos grasos (síntesis de proteínas transportadoras de acilos), y la captación de oxígeno (hemoglobina). Los resultados se muestran como *fold-change* respecto al grupo control (número de veces que se ve modificada la expresión del gen estudiado siendo 1 el valor del grupo control).

3.6.3.1 Extracción ARN

Las muestras biológicas procedentes del ensayo crónico de exposición conjunta finalizado a los 21 días de vida de los individuos fueron conservadas en seco en un ultracongelador de -80 °C hasta su uso. Tras realizar ensayos previos para estimar la cantidad óptima de material biológico necesario para obtener una concentración adecuada de ARN, se determinó que un individuo adulto por réplica era suficiente, con un total de 6 réplicas por condición de exposición.

Para la extracción del ARN se empleó el kit comercial de la casa Norgen Biotek Corp. (Canadá) “*Total RNA purification kit*” (Ref: 17200), según las instrucciones del fabricante.

Una vez extraído, el ARN se analizó para determinar la concentración en cada una de las muestras (ng/μL), y la pureza de cada una de las

mismas analizando las fracciones de absorbancia 260/280 y 260/230 empleando el equipo NanoDrop™ One (ThermoScientific™). En todos los casos, las muestras empleadas para la posterior síntesis de ADN complementario (ADNc) presentaron una pureza óptima de ARN (valores comprendidos entre 2.0 - 2.2 para la fracción 260/280), y sin presencia de contaminación por sales, carbohidratos, o fenoles (>1.5 para la fracción 260/230) (BancoADN, Universidad Carlos III, Salamanca 2020). El RNA extraído fue preservado a -80 °C para evitar su degradación.

3.6.3.2 Síntesis ADNc

Para la síntesis del ADNc se empleó el kit “*PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time)*” (Ref: RR037A) de la casa comercial Takara Bio Inc. Siguiendo las instrucciones del fabricante se calculó la cantidad necesaria de ARN para obtener en la reacción 1 µg de ADNc.

Para realizar la transcripción inversa se preparó cada una de las muestras de forma independiente, conteniendo los volúmenes de reactivos indicados en la Tabla 4. La incubación para la transcripción inversa se llevó a cabo en un termociclador T100 (BIO-RAD) durante 15 minutos a 37 °C, 5 segundos a 85 °C para la inactivación de la enzima mediante choque térmico. Se incluyó un control con todos los reactivos menos enzima retrotranscriptasa que garantizó que en el proceso de extracción no hubiese quedado residuos de ADN.

Todas las muestras de ADNc se preservaron inmediatamente a -20 °C hasta la realización de la PCR a tiempo real.

Tabla 4.- Transcripción inversa. Volumen empleado por reacción. Cantidades calculadas en base a la concentración de partida del ARN extraído (*).

Reactivo	Cantidad (µl)	Concentración final
5X PrimeScript Buffer	2	1x
Enzima	0.5	-
Oligo dT Primer (50 µM)	0.5	25 pmol
Random 6 mers (100 µM)	0.5	50 pmol
Total RNA	*	*
H ₂ O libre de RNasas	*	*

Fuente: www.takarabio.com

3.6.3.3 Expresión de los genes

El estudio de la expresión génica se realizó de manera semicuantitativa, empleando como gen de referencia *GAPDH* (Heckmann *et al.*, 2006), utilizando el Sistema de Detección de PCR en Tiempo Real QuantStudio 5 (ThermoScientific™) con bloque para placa de 384 pocillos. Se realizó un triplicado técnico para cada una de las 6 réplicas biológicas que contuvo en un volumen final de 10 µL: 5 µL de TB Green Premix Ex Taq (Takara), 0.5 µL de cada una de las parejas de cebadores específicos para el gen diana procedentes de un stock 5 µM, 0.25 µL de cDNA de la muestra, 3.55 µL de agua bidestilada estéril y 0.2 µL del control interno ROX (Takara) para la normalización de la fluorescencia ajena al ensayo.

La PCR a tiempo real se llevó a cabo en las condiciones siguientes: un paso inicial de activación a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación con 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C

seguidos de 15 segundos a 72 °C. Para poder determinar que la amplificación era debida a un único producto en cada reacción (específica del gen), se llevó a cabo una fase de disociación al finalizar los ciclos de amplificación a 90 °C.

Las secuencias de las parejas de oligonucleótidos específicos, tal y como se indica en la Tabla 5, se obtuvieron de la bibliografía. Su síntesis fue llevada a cabo por la casa Condalab. Antes de proceder a realizar los ensayos, se testó cada una de las parejas con ADNc procedente de dafnias control con el fin de establecer los parámetros óptimos para la realización de la PCR a tiempo real. Todas las parejas dieron buenos resultados de eficiencia (valores comprendidos entre 80 y 106 %) para una temperatura de hibridación de 60 °C.

El análisis de los datos obtenidos en las PCR a tiempo real, fue realizado mediante el programa “QuantStudio™ Design & Analysis Software” de la casa ThermoFisher.

Tabla 5.- Pares de cebadores empleados en el análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo real.

Gen	Cebador	Secuencia 5'-3'	Referencia
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	DMqgapdh	F-TGCTGATGCCCAATGTTGTTGT	Heckmann <i>et al.</i> , 2006
		R-GCAGTTATGGCGTGGACGGTTGT	
Viteleninas	DMqvtg1	F-CCAGCGAATCCTACACCGTCAAG	
		R-GAGCCGCACAGACCACAGAG	
	DMqvtg2	F-CGTCCGCCACTGGTTGGGTC	
		R-GGGGCAGCCAAGACAGAGCG	
Metalotioneinas	DMqmmt-a	F-GAGCGCCATGCCAAAATCCC	
		R-TCGTGTTGTAAAATCCGGCT	
	DMqmmt-b	F-TGGAACCGAATGCAAATGCG	
		R-CGGACTTGCATGGACAACCTG	
DMqmmt-c	F-AAAGTGTGCCCTCGTTGTCA	Seyoum y Pradhan, 2019	
	R-CTTACAGTCGTCCCCACACG		
Glutación-S-transferasa	DMqgst		F-TCAGGCTGGTGTGAGTTTG
			R-GAGCAAGCATTGTGCATCA
Catalasa	DMqcatF	F-TGGCGGAGAAAGCGGTTTCAGC	
		R-GTGCGTGGTCTCTGGGCGAA	
Proteínas de choque térmico	DMqhsp70	F-CGACGGCGGGAGATACGCAC	
		R-CCACGGAAAAGGTCGGCGCA	
	DMqhsp90	F-CCCTCTGTGACACTGGTATTGGCA	
		R-GCCCATGGGTCTCCATGGTCAG	
Proteína transportadora de acilo	DMqfab	F-GCCAACTACCTGTATCCTGAATG	
		R-GTGAACGCTCCGCTAACT	
Hemoglobina	DMqdhb1	F-ACAAATTGCTCTGGTTGCCG	Zeis <i>et al.</i> , 2003
		R-AAGGTTTTTGAGTGCCACGT	
	DMqdhb2	F-TGTTACCACCAGTGTCACCA	
		R-TATTCAGGGTGGCCTTGAT	
	DMqdhb3	F-ACTACTGTCACCACCCTTTC	
		R-TTGGTCAAAGCTCGGCTTG	

3.7 Análisis estadístico

Se realizó el análisis Probit de regresión para determinar los valores de CE₅₀ y sus límites de confianza (95 %) en el ensayo de toxicidad aguda para los plaguicidas procloraz y piriproxifen en *D. magna* a 24 y 48 horas.

La normalidad de las variables (datos no transformados procedentes de los resultados obtenidos para los bioensayos en el alga y en dafnia) se verificó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y Lilliefors, y la homogeneidad en la varianza mediante el test de Levene.

Los ensayos comprendidos por 15 individuos por condición (ensayos crónicos OECD) se subdividieron en 5 grupos de 3 individuos obteniendo 5 réplicas finales, sobre los que se calculó la media para posteriormente realizar la estadística correspondiente. En los casos en los que el número de individuos fue inferior, se trató cada uno como réplica independiente.

Los resultados obtenidos en todos los ensayos para procloraz y piriproxifen fueron comparados con el fin de determinar los posibles efectos tóxicos causados mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA). El test *post-hoc* Dunnett se empleó en aquellos supuestos donde se contrastó si los tratamientos resultaban ser diferentes respecto al grupo control. El test *post-hoc* Tukey se empleó en el estudio crónico de la generación F1 de recuperación vs presencia de plaguicida para evaluar posibles diferencias entre todos los grupos que compusieron el ensayo. En todos los casos el nivel de significación se fijó en $p < 0.05$. Cuando fue posible, se calculó la CE₅₀, y el coeficiente de correlación de

Pearson para los diferentes parámetros estudiados frente a las concentraciones ensayadas.

Para los datos registrados de forma secundaria a lo largo de los ensayos realizados conjuntamente con F0 (siendo la finalidad principal la evaluación de posibles alteraciones en la bioquímica y expresión génica de los individuos), se realizó una estadística descriptiva.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa informático GraphPad Prism (Version 7) para Windows (GraphPad Software, Inc.).

4. Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Fungicida procloraz

4.1.1 Toxicidad aguda

Los porcentajes de inmovilización obtenidos en el ensayo agudo (24 y 48 horas) para el fungicida procloraz en *D. magna* se muestran en la Tabla 6, para cada una de las concentraciones testadas, al igual que la CE_{50} y los límites de confianza correspondientes. Las concentraciones ensayadas fueron 8, 9, 10, 11 y 12 mg/L para el ensayo a 24 y 48 horas. Tras analizar los valores obtenidos para la CE_{50} a cada uno de los tiempos de ensayo, conforme aumentó el tiempo de exposición al fungicida aumentó ligeramente la inmovilización de los animales, pues la concentración necesaria para obtener el 50 % de animales inmóviles a 48 horas fue ligeramente inferior (9.228 mg/L) que a 24 horas (9.637 mg/L).

Tabla 6.- Concentraciones empleadas para cada uno de los tiempos de exposición de procloraz en *D. magna*, porcentajes (%) de inmovilización obtenidos, y cálculo de la CE_{50} y límites de confianza.

24 horas		48 horas	
Concentración (mg/L)	% Inmovilización	Concentración (mg/L)	% Inmovilización
8	0	8	20
9	50	9	65
10	63	10	45
11	76	11	85
12	93	12	100
$CE_{50} = 9.637$ mg/L [8.730 – 10.355]		$CE_{50} = 9.228$ mg/L [8.602 - 9.705]	

En ambos casos, la relación dosis-dependiente se comporta de manera lineal. En las Figuras 10 y 11, donde se representan gráficamente los porcentajes de inmovilización frente a las diferentes concentraciones ensayadas del fungicida procloraz. A las 24 y 48 horas la correlación lineal entre ambas variables presenta una r^2 de 0.90 y 0.80 respectivamente.

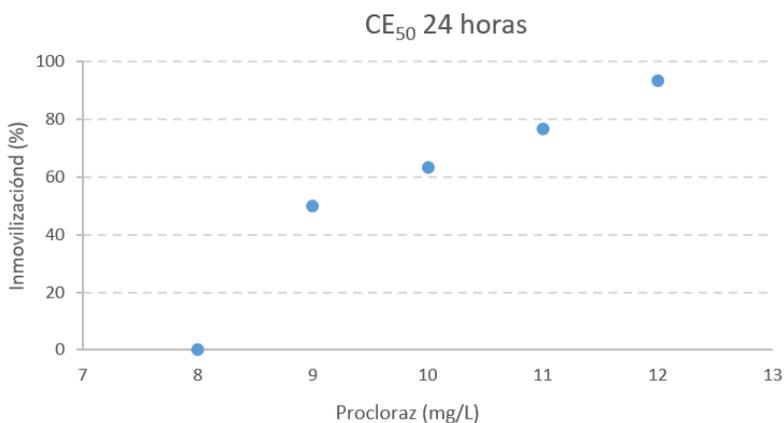


Figura 10.-Curva dosis-respuesta obtenida tras 24 horas de exposición al fungicida procloraz en neonatos de *D. magna*.

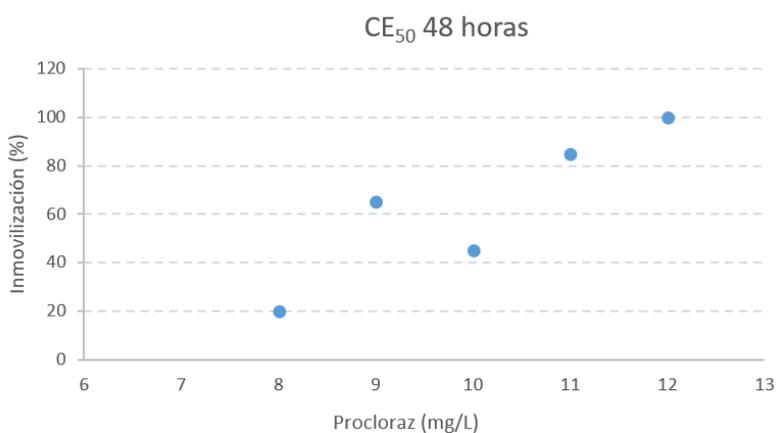


Figura 11.-Curva dosis-respuesta obtenida tras 48 horas de exposición al fungicida procloraz en neonatos de *D. magna*.

Se observa que el principal efecto ejercido por el fungicida sobre la inmovilización se registra en las primeras 24 horas, ya que la diferencia entre ambas CE_{50} supone solo un descenso en la concentración del 5 % de procloraz para conseguir el mismo efecto a 48 horas.

4.1.2 Efecto sobre el comportamiento alimenticio

Como se indicó en el apartado 3.4 de Material y Métodos, neonatos procedentes de la colonia fueron expuestos durante 5 horas al fungicida procloraz, haciendo uso de las mismas concentraciones que posteriormente se emplearán en los ensayos de toxicidad crónica, con la finalidad de evaluar si se producía alguna alteración sobre la capacidad de filtración o ingesta del alga *Nannochloris oculata*.

El fungicida no causó ningún efecto sobre los parámetros de filtración e ingestión derivados de la exposición (Figura 12). El análisis ANOVA no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las concentraciones ensayadas frente al grupo control.

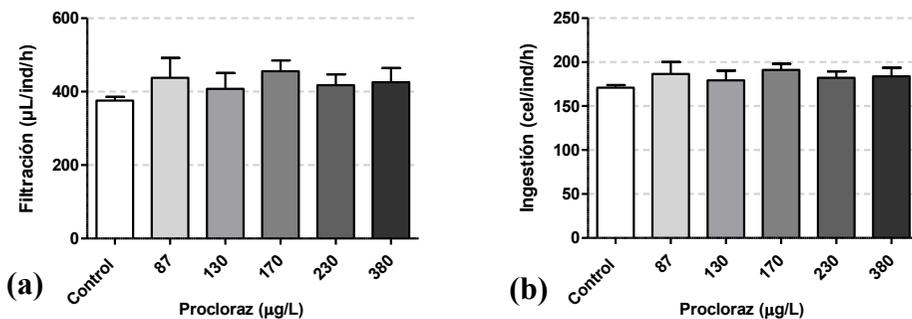


Figura 12.- Tasas de filtración (a) e ingestión (b) del alga *N. oculata* por parte de *D. magna* expuesta durante 5 horas a diferentes concentraciones subletales del fungicida procloraz.

4.1.3 Toxicidad crónica

El estudio de la toxicidad crónica para el fungicida procloraz, siguió el protocolo reflejado en el apartado de Material y Métodos 3.5. Las concentraciones subletales en los ensayos de la generación parental F0 a las que se expusieron cada uno de los grupos, corresponden a las fracciones equivalente de la CE₅₀ a 48 horas 1/107, 1/71, 1/55, 1/40 y 1/24, como se indicó en el apartado 3.4. Las concentraciones equivalentes en µg/L se recogen en la Tabla 3 del mismo apartado. En el ensayo crónico generación filial F1, se empleó únicamente la fracción de CE₅₀ más alta, 1/24 (380 µg/L). A lo largo del ensayo se registraron los datos de todos los parámetros indicados en el apartado 3.5.1 para la evaluación del efecto tóxico sobre el crecimiento y la reproducción de los individuos.

1.1.3.1 Exposición individual generación F0. Test de reproducción de *D. magna*

Los resultados del estudio de toxicidad crónica durante 21 días (OECD 211, 2012), se muestran en la Tabla 7. Los datos que se registraron de los parámetros reproductivos pusieron de manifiesto que ninguna de las concentraciones ensayadas del fungicida provocó alteraciones en la reproducción de las hembras F0 expuestas durante 21 días: tamaño de la camada, número de camadas, tiempo a la primera puesta, número de neonatos por hembra, y longevidad.

Tras realizar el análisis estadístico ANOVA, se evidenció que no existían diferencias estadísticamente significativas en los diferentes tratamientos frente al grupo control. Sin embargo, al observar los valores de tamaño de la camada y número de neonatos por hembra, sí se vio una

ligera disminución en la concentración más baja ensayada, 87 $\mu\text{g/L}$, aunque no resultó ser estadísticamente significativa al compararla frente al grupo control.

La **tasa intrínseca de crecimiento natural**, índice que contempla varios de los parámetros estudiados, como se indicó en el apartado 3.5.1, sí se alteró. En la Figura 13 se representan porcentualmente los valores obtenidos para la tasa intrínseca de crecimiento natural en los diferentes tratamientos. El grupo expuesto a la concentración más baja de fungicida mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control, con una reducción promedio del 12 % respecto a éste.

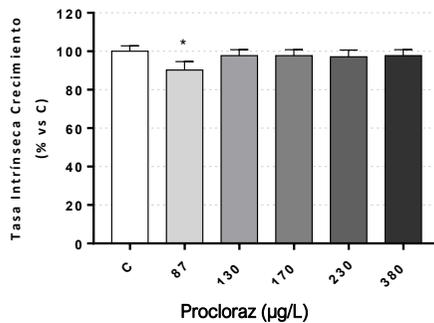


Figura 13.- Porcentaje de variación frente al control (C), de los valores de la tasa intrínseca de crecimiento natural determinados en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del fungicida procloraz. * $p < 0.05$.

Tabla 7.- Valores medios y desviaciones típicas de los parámetros estudiados en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones de procloraz durante 21 días.

Tratamiento	Tamaño de la camada	Nº de camadas	Tiempo a la primera puesta (días)	Nº de neonatos por hembra	Longevidad (días)	Longitud corporal (mm)
Control	26.74 ± 1.61	5.17 ± 0.24	7.70 ± 0.38	138.40 ± 11.62	21.00 ± 0.00	4.72 ± 0.12
87 µg/L	24.63 ± 1.61	4.87 ± 0.18	8.16 ± 0.88	120.30 ± 9.11	21.00 ± 0.00	4.58 ± 0.06*
130 µg/L	25.01 ± 1.33	5.00 ± 0.00	8.00 ± 0.23	125.10 ± 6.67	21.00 ± 0.00	4.55 ± 0.08*
170 µg/L	27.63 ± 1.66	4.93 ± 0.28	8.13 ± 0.38	136.00 ± 11.57	21.00 ± 0.00	4.59 ± 0.04
230 µg/L	25.50 ± 2.04	4.83 ± 0.24	8.07 ± 0.37	123.10 ± 7.42	21.00 ± 0.00	4.58 ± 0.11*
380 µg/L	27.58 ± 1.82	5.13 ± 0.18	8.13 ± 0.38	141.30 ± 9.01	21.00 ± 0.00	4.47 ± 0.03*

*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al grupo control.

El crecimiento individual se valoró a partir de los datos de **longitud corporal** de las dafnias expuestas al fungicida. Las dafnias que estuvieron expuestas a la mayoría de concentraciones del ensayo alcanzaron una longitud corporal inferior a la de las hembras del grupo control a los 21 días de edad. La Figura 14 representa el porcentaje de los valores (% respecto al grupo control). En los diferentes tratamientos la longitud corporal media de las hembras se redujo entre un 3 y un 5.3 % frente al tamaño de las dafnias del grupo control.

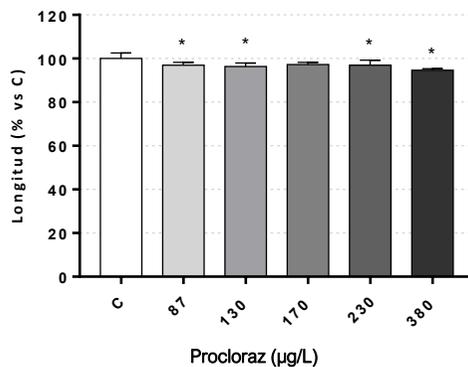


Figura 14.- Porcentaje de variación frente al control (C), de los valores de longitud corporal determinados en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del fungicida procloraz. * $p < 0.05$.

El análisis de la varianza (ANOVA) mostró diferencias estadísticamente significativas. El posterior test de Dunett determinó que, para todas las concentraciones ensayadas salvo 170 µg/L, la longitud media de las hembras expuestas al fungicida disminuyó tras los 21 días de exposición.

De forma paralela también se registraron medidas de la anchura y la longitud de la cámara incubadora, y se relacionaron con la anchura y la longitud corporal del individuo, no hallándose diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los tratamientos.

Tampoco se hallaron diferencias en la relación entre la longitud de la espina caudal y la longitud total del individuo, a ninguna de las concentraciones de exposición respecto al grupo control.

En la Figura 15 se muestran fotografías de un individuo perteneciente al grupo control, y un individuo de la concentración más alta ensayada, 380 $\mu\text{g/L}$, al finalizar el ensayo.

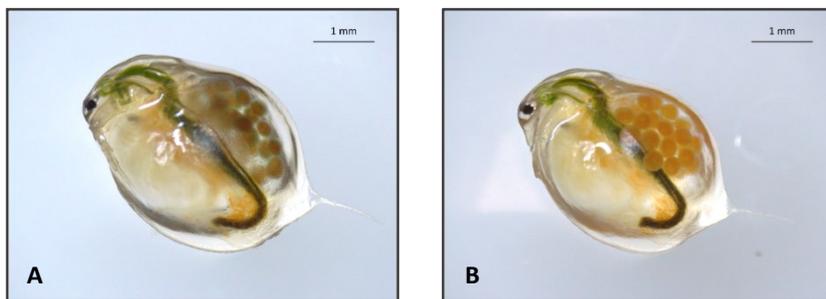


Figura 15.- Imagen **A**: hembra del grupo control del experimento crónico con procloraz con un fenotipo propio de un individuo normal a los 21 días de edad. Imagen **B**: hembra tras 21 días de tratamiento con procloraz a una concentración de 380 $\mu\text{g/L}$, con coloración anaranjada más evidente en las puestas dentro de la cámara incubadora. Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico, aumentos 30x.

Cualitativamente se observó que las dafnias expuestas a las concentraciones más elevadas de procloraz presentaban una coloración distinta, pasando de tener una tonalidad parda en las dafnias control, a anaranjada en las tratadas, siendo este cambio más evidente en los embriones de la cámara incubadora.

Análisis morfológico de las camadas

Tras analizar los individuos pertenecientes a la 3^a, 4^a y 5^a camadas (recolectados y preservados en etanol absoluto para su análisis en el microscopio estereoscópico), se observó que tanto en el grupo control, como en las concentraciones 87 y 130 µg/L, todos los neonatos fueron hembras con una morfología normal. A partir de la concentración de 170 µg/L empezaron a registrarse malformaciones, y la presencia de las mismas se incrementó conforme lo hizo la concentración de exposición. Solo se pudo determinar el sexo de los individuos con morfología normal pertenecientes a las tres concentraciones más elevadas, y todos fueron hembras.

Respecto a la aparición de malformaciones, para la concentración de 170 µg/L solo se registraron el día 21 del ensayo. Para la concentración de 230 µg/L, el registro de malformaciones tuvo lugar los días 17 y 21 del ensayo, aunque la mayor incidencia tuvo lugar el día 21, en el que la totalidad de los individuos analizados, pertenecientes a 2 camadas íntegras, presentaron malformaciones (44 individuos de 2 madres). Para la concentración de 380 µg/L, el porcentaje total de neonatos con malformaciones fue inferior a las dos concentraciones anteriores, pero la presencia de malformaciones fue más homogénea durante todas las camadas, encontrándose individuos malformados los días 16, 17, 19, 20 y 21 del ensayo. La prevalencia de individuos malformados respecto al total de neonatos observados fue del 10, 15 y 8.6 % para las concentraciones 170, 230 y 380 µg/L respectivamente.

Todos los individuos que registraron malformaciones independientemente de la concentración, presentaron la misma anomalía en el caparazón. En la Figura 16 se muestran dafnias neonatos con dicha aberración en la morfología del caparazón el cual, en lugar de presentar las valvas simétricas y juntas cubriendo dorsolateralmente al animal, se encuentran separadas dejando el cuerpo del animal expuesto. Los neonatos estaban vivos en el momento de la recolección, y aunque esta anomalía probablemente imposibilitaría la correcta natación, no se realizó un seguimiento de los mismos ya que se preservaron directamente en etanol.



Figura 16.- Neonatos malformados de dafnias expuestas a procloraz durante el test de reproducción en *D. magna*. Se observa: cuerpo eyectado del caparazón que no cubre la totalidad del animal a partir de la zona torcoabdominal. Fotografía tomada con microscopio estereoscópico, aumentos 55x.

4.1.3.2 Exposición individual generación F1: ausencia vs presencia del plaguicida

Los neonatos correspondientes a la tercera puesta de la concentración más alta testada (380 $\mu\text{g/L}$), se destinaron a realizar un nuevo ensayo crónico siguiendo el protocolo establecido por la OECD 211 (2012) como ya se indicó en el capítulo 3.5.2 de Material y Métodos.

Para diferenciar los grupos se empleará la abreviación “TT 380” (tratado/tratado) para aquel grupo que vuelve a someterse a la misma condición que las progenitoras, y “TL 380” (tratado/libre de plaguicida) para el que se establece en medio exento de tóxico. El grupo control estuvo integrado por hijas procedentes de madres control del ensayo crónico F0. En la Figura 17 se observan fotografías de tres hembras al finalizar los experimentos.



Figura 17.- Hembras F1 de 21 días de edad del ensayo con procloraz. **A:** dafnia perteneciente al grupo control. **B:** hembra del grupo TL, con morfología similar a la del grupo control. **C:** hembra del grupo TT, con coloración de los huevos en desarrollo (anaranjados). Diferente a la observada en los grupos control y TL (marrón-pardo). Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico, aumentos 30x.

Se observa que la hembra control (A) y TL 380 (B) presentan una morfología acorde a una hembra de 21 días de edad. Sin embargo, la hembra del grupo TT 380 (C), presenta una coloración diferente (al igual

que en las madres F0, apartado 4.1.2.1), siendo más evidente en los huevos de la cámara incubadora.

Como se refleja en la Tabla 8, los parámetros individuales tamaño de la camada y número de neonatos por hembra fueron los que registraron alguna alteración en contraste con los determinados en el grupo control. El número de camadas, tiempo a la primera puesta, longevidad y longitud no se vieron afectados.

El **tamaño de la camada** se vio ligeramente alterado en ambos grupos experimentales respecto al grupo control. El análisis ANOVA y posterior test de Tukey mostraron que en el caso de los individuos del grupo TT 380, se produjo un aumento en el tamaño de la camada (17 % respecto al grupo control). Contrariamente, en las dafnias del grupo TL 380, se observó un descenso del tamaño de la camada (15 % respecto al grupo control). Además, se evidenció que las diferencias en el tamaño de la camada entre los grupos TT 380 y TL 380 también eran estadísticamente significativas. La Figura 18 muestra la representación gráfica de los resultados como porcentaje respecto al grupo control.

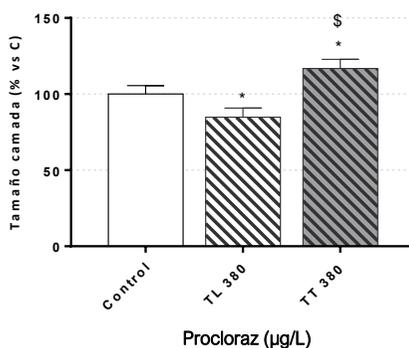


Figura 18.- Porcentaje de variación frente al control (C) y entre tratamientos, de los valores del tamaño de la camada determinados en *D. magna* en el ensayo con F1. *Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$).
[§]Diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$).

Tabla 8.- Valores medios y desviaciones estándar de los parámetros estudiados en *D. magna* en el ensayo de recuperación vs presencia de procloraz durante 21 días de la generación F1.

Tratamiento	Tamaño de la camada	Nº de camadas	Tiempo a la primera puesta (días)	Nº de neonatos por hembra	Longevidad (días)	Longitud corporal (mm)
Control	22.95 ± 1.29	4.73 ± 0.28	8.87 ± 0.73	108.50 ± 10.44	21.00 ± 0.00	4.31 ± 0.06
TL 380 µg/l	19.46 ± 1.38*	4.73 ± 0.13	8.47 ± 0.51	92.53 ± 9.66*	21.00 ± 0.00	4.20 ± 0.05
TT 380 µg/l	26.82 ± 1.37*§	4.60 ± 0.15	8.33 ± 0.41	122.70 ± 8.16	21.00 ± 0.00	4.30 ± 0.07

*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al grupo control.

§Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre TT y TL.

En el caso del **número de neonatos por hembra**, el análisis de la varianza (ANOVA) y test *post hoc* Tukey mostró que el grupo que había sido puesto en medio libre de procloraz tras proceder de madres expuestas a la concentración más alta del fungicida, mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control con una reducción del 15 %. El grupo que mantuvo las condiciones de exposición al plaguicida no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control, tal y como se observa en la Figura 19.

Ambos grupos de neonatos procedentes de madres expuestas a la concentración más alta de procloraz, TL 380 y TT 380, mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí.

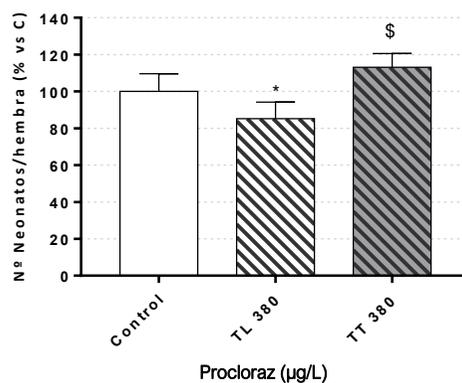


Figura 19.- Porcentaje de variación frente al control (C) y entre tratamientos, de los valores del número de neonatos por hembra determinados en *D. magna* en el ensayo con F1. *Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$). \$Diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$).

Respecto a la **tasa intrínseca de incremento natural**, solo se observaron alteraciones al comparar ambos grupos procedentes de madres expuestas, TL 380 y TT 380. En la Figura 20 se muestran los datos obtenidos como porcentaje respecto al grupo control.

El test *post-hoc* Tukey puso de manifiesto que dichas diferencias se encontraban entre ambos grupos tratados, mientras que no se hallaron diferencias de éstos frente al grupo control.

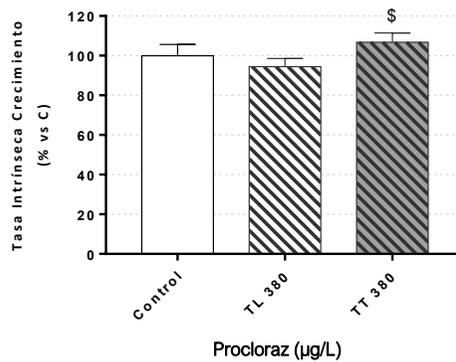


Figura 20.- Porcentaje de variación frente al control (C) y entre tratamientos, de los valores de la tasa intrínseca de crecimiento natural determinados en *D. magna* en el ensayo con F1. ^{\$}Diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$).

En la Figura 21 se observa cómo, a pesar de no haber encontrado diferencia en la **longitud corporal** de los distintos grupos, la relación del tamaño de la cámara incubadora respecto al tamaño del individuo sí aumentó en el grupo TT un 20% respecto al grupo control de forma estadísticamente significativa, al igual que la proporción entre la espina caudal y la longitud total del individuo (aumentó en un 23 %). Las diferencias entre ambos grupos TT no resultaron estadísticamente significativas.

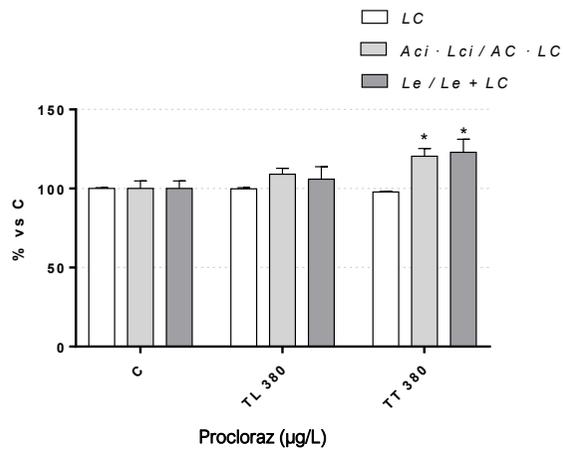


Figura 21.- Porcentaje de variación frente al control (C) y entre tratamientos, de la longitud corporal (LC), proporción cámara incubadora (Aci·Lci) respecto al tamaño corporal (AC·LC), y proporción espina caudal (Le) respecto a la longitud total (Le+LC) en *D. magna* en el ensayo con F1 con procloraz. *Diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p < 0.05$).

4.1.3.3 Exposición conjunta generación F0

A lo largo del ensayo, se registró la supervivencia de las madres y se recolectaron las camadas diariamente. Con ambos datos se configuró un gráfico para ver de qué forma evolucionaron ambos parámetros a lo largo de los 21 días de experimentación. En la Tabla 9 se muestra el tamaño promedio de la camada respecto al número de hembras en cada momento, y en la Tabla 10 los datos de supervivencia de las hembras asociado a cada camada (la agrupación de camadas, f , se realizó cada 3 días desde el primer día en que se registró progenie en el grupo control, agrupándose en 5 camadas totales, referidas a la supervivencia promedio de las madres correspondiente a esa franja periódica).

Tabla 9.- Tamaño promedio de la camada agrupada en función del número de neonatos y supervivencia de las hembras expuestas a procloraz en el ensayo conjunto F0.

Grupo	$f1_1$	$f1_2$	$f1_3$	$f1_4$	$f1_5$
Control	15.95	19.40	13.78	16.85	14.20
Concentración Procloraz $\mu\text{g/L}$					
87	22.08	22.51	18.72	15.21	20.72
130	17.83	20.90	13.74	27.89	23.78
170	20.93	21.70	14.52	31.60	21.19
230	13.25	20.33	16.89	33.12	29.73
380	7.74	20.20	15.84	27.04	37.90

Tabla 10.- Supervivencia promedio de las dafnias control y expuestas a procloraz correspondiente a cada una de las agrupaciones de camadas a lo largo del ensayo conjunto.

Grupo	<i>f</i>1₁	<i>f</i>1₂	<i>f</i>1₃	<i>f</i>1₄	<i>f</i>1₅
Control	40	40	40	40	40
Concentración Procloraz µg/L					
87	40	39	38,5	37,5	36
130	40	39	36	33,5	31,5
170	40	39,5	36,5	29	23,5
230	40	39	33,5	24	18,5
380	40	38,5	31,5	22,5	18,5

En la Figura 22 se representan los resultados globales obtenidos en este ensayo para el número acumulativo de neonatos recolectados y la supervivencia de las hembras a lo largo de los 21 días de duración del ensayo. Mientras que la supervivencia de las hembras a lo largo del tiempo fue decreciendo conforme aumentaba la concentración de tóxico, el número de neonatos aumentó, no produciéndose un descenso proporcional en el número de neonatos respecto a las hembras que quedaron en el experimento a lo largo del tiempo. Al finalizar el ensayo (día 21), todas las concentraciones excepto la más alta (380 µg/L), tuvieron en total más neonatos que las hembras del grupo control, a pesar de ser el único grupo en el que todos los individuos adultos alcanzaron los 21 días de edad.

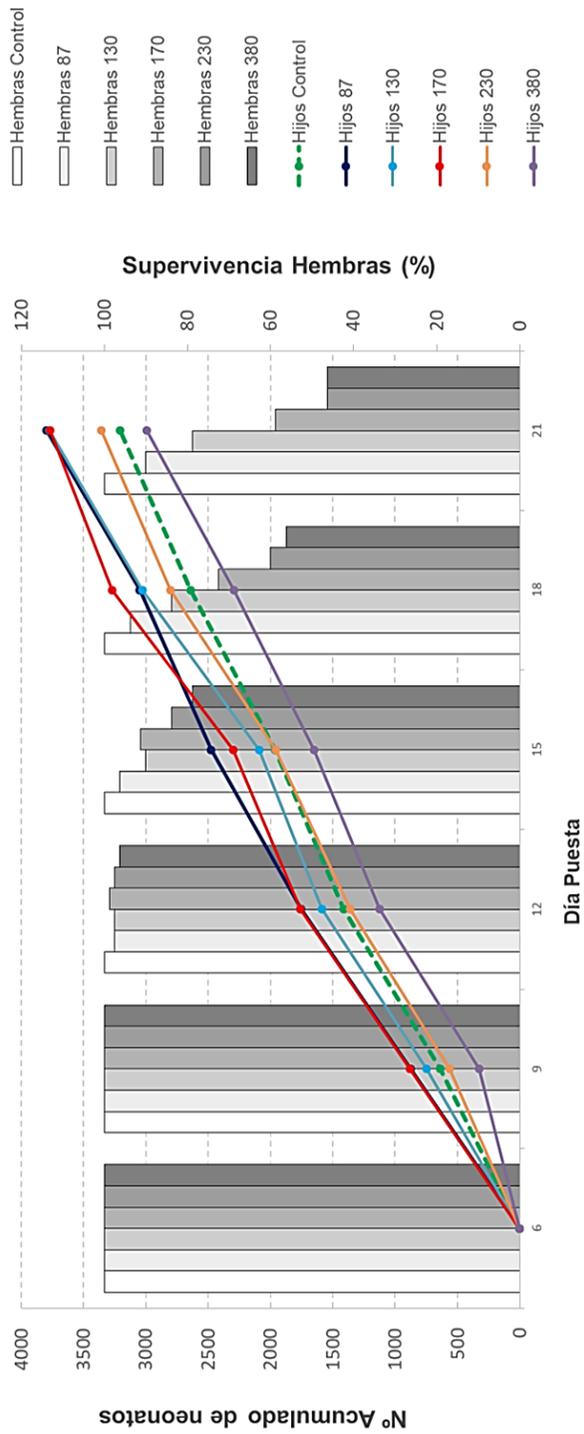


Figura 22.- Representación gráfica de la evolución de la supervivencia de las dafnias expuestas a procloraz a lo largo del tiempo (eje derecho), y el número de neonatos acumulativo para cada condición de exposición ($\mu\text{g/L}$).

Se observó el patrón de coloración citado en el apartado 4.1.2.1 de los ensayos crónicos de reproducción de *D. magna* (OECD): mientras que las hembras control tendieron a ser pardas, las tratadas adquirieron una tonalidad anaranjada, más evidente en los embriones. La Figura 23 recoge las imágenes de una hembra del grupo control, y una hembra del grupo tratado a 380 $\mu\text{g/L}$, a día 21.

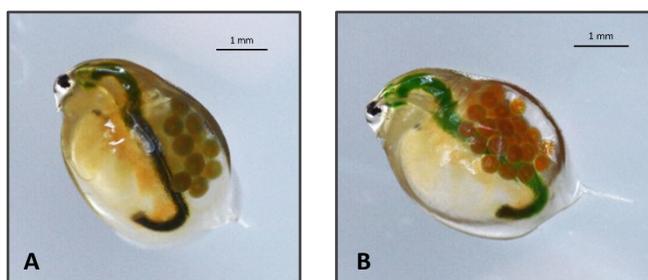


Figura 23.- Daphnias a 21 días procedentes del ensayo conjunto de F0 expuestas a procloraz. **A:** dafnia procedente del grupo control. **B:** dafnia procedente del grupo tratado con 380 $\mu\text{g/L}$, a los 21 días. Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico, aumentos 30x.

Se realizó la medición de 10 individuos de cada grupo experimental el día 21 (Figura 24). El análisis estadístico determinó que todas las dafnias expuestas a las diferentes concentraciones del fungicida alcanzaron un tamaño superior, entre un 5 y 7 %, respecto de las dafnias control. Además, la relación tamaño de la cámara incubadora y tamaño del individuo aumentó de forma estadísticamente significativa para todos los tratamientos, llegando a alcanzar casi un 30 % respecto al grupo control en los individuos expuestos a la concentración más alta de procloraz.

La relación longitud de la espina caudal y longitud total del individuo también aumentó casi un 100 % respecto a los valores obtenidos para el

grupo control, de forma estadísticamente significativa en todos los tratamientos.

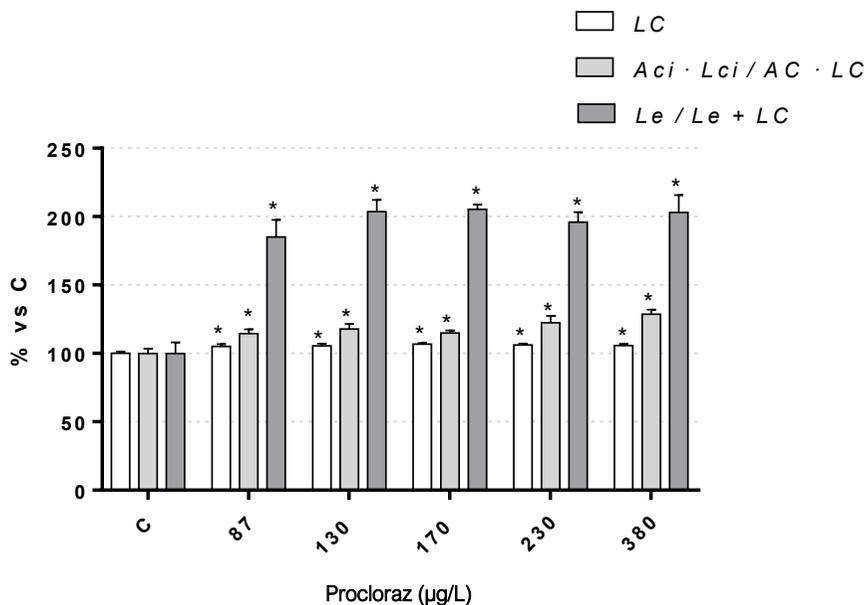


Figura 24.- Porcentaje de variación frente al control (C) y entre tratamientos, de la longitud corporal (LC), proporción cámara incubadora (Aci·Lci) respecto al tamaño corporal (AC·LC), y proporción espina caudal (Le) respecto a la longitud total (Le+LC) en *D. magna* en el ensayo F0 conjunto con prochloraz. *Diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p < 0.05$).

Estudio morfológico de los neonatos

Se recolectaron más de 20000 neonatos que se preservaron y analizaron siguiendo el protocolo indicado en el apartado 3.7. La Tabla 11 muestra la prevalencia de individuos malformados hallados en cada una de las concentraciones de ensayo y el grupo control.

Tabla 11.- Presencia de neonatos malformados (%) respecto al total de individuos recolectados durante los 21 días para el grupo control y cada uno de los tratamientos de procloraz ($\mu\text{g/L}$).

Grupo	Control	87	130	170	230	380
Total	3322	3861	3837	3888	3441	3220
Neonatos malformados	0.48	0.81	1.37	1.12	1.10	3.60

El porcentaje de neonatos malformados aumentó con la concentración de exposición. En el grupo control se registró un 0.48 % de neonatos con malformaciones; para los neonatos procedentes de la exposición a procloraz aumentó el porcentaje de individuos malformados llegando a alcanzar en la concentración más alta de exposición un 3.6 %.

Entre las malformaciones halladas en los neonatos encontramos espina caudal no extendida o deformada (Figura 25, B-C), ojos no desarrollados o subdesarrollados (Figura 25, D-E), antenas subdesarrolladas o malformadas, defectos en el caparazón, e individuos con malformaciones a nivel general (Figura 25 D-H). Sin embargo, el porcentaje mayoritario (54%), estuvo representado por individuos que se encontraban en un estadio de desarrollo inferior al correspondiente para

neonatos de 24 horas (Figura 25, A). Un 30 % de los individuos malformados estuvo representado por defectos en la espina caudal, y un 6 % por individuos con anomalías en el caparazón. El 10 % restante presentaban combinación de malformaciones. No se observó vinculación entre la aparición de un determinado tipo de malformación y la concentración de exposición, pues en todas las concentraciones de procloraz se encontraron neonatos con cualquiera de las malformaciones descritas.

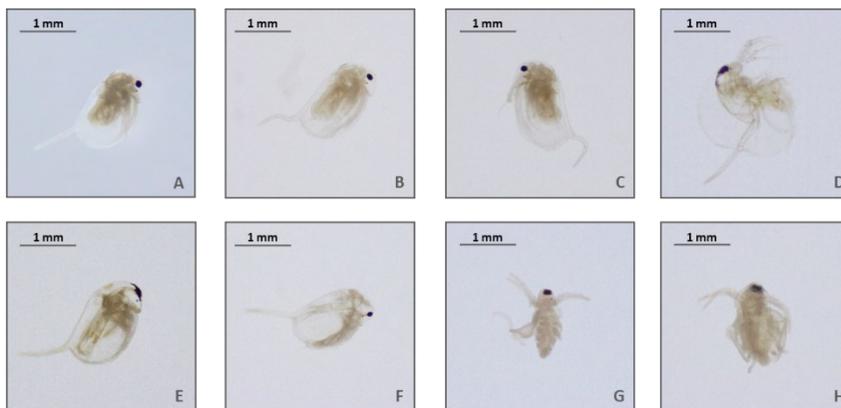


Figura 25.- Imágenes de neonatos (F1) procedentes del ensayo conjunto F0 (edad \leq 24 horas). Neonato control (A) con desarrollo normal, (B-H) neonatos con algunas de las malformaciones encontradas durante el ensayo conjunto de F0 expuesta a procloraz.

4.1.4 Parámetros bioquímicos

Los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros estudiados se recogen en las Tabla 12.

Como se observa en la Figura 26, la concentración de **proteínas totales** aumentó en las dafnias expuestas conforme lo hizo la concentración de exposición a procloraz respecto a los valores obtenidos para el grupo control. Se corroboró estadísticamente que dichas diferencias eran significativas ($p < 0.05$). Este aumento varió en promedio un 16 % para las concentraciones ensayadas más bajas, llegando a alcanzar un 37 % en las concentraciones más altas.

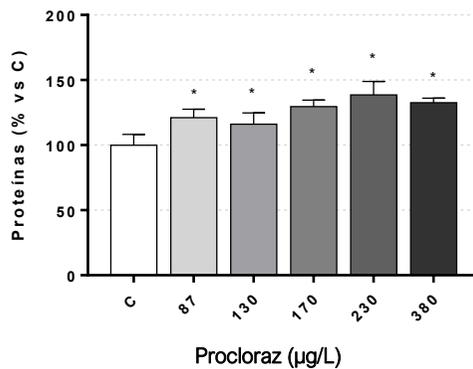


Figura 26.- Porcentaje de variación frente al control (C), del contenido proteico en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del fungicida procloraz. *Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$).

Ni el contenido en **colesterol total** ni el contenido en **triglicéridos** varió en los grupos expuestos a procloraz de forma estadísticamente significativa, respecto de las dafnias del grupo control ($p > 0.05$). Aunque en la Tabla 12 se observan fluctuaciones en los valores normalizados por

Tabla 12.- Valores medios y desviaciones típicas de los metabolitos bioquímicos estudiados en individuos de *D. magna* expuestos a diferentes concentraciones del fungicida procloraz durante 21 días, por mg/mL y por individuo (ind).

Tratamiento	Contenido proteico (mg/mL/ind)	Colesterol (mg/mL/ind)	Triglicéridos (mg/mL/ind)	Glucosa (mg/mL/ind)	Lactato (mg/mL/ind)	LDH (U/ml/ind)
Control	1.46 ± 0.12	0.12 ± 0.01	0.41 ± 0.04	0.68 ± 0.04	0.12 ± 0.04	0.03 ± 0.01
87 µg/L	1.77 ± 0.10*	0.12 ± 0.01	0.53 ± 0.12	1.14 ± 0.15*	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.01*
130 µg/L	1.70 ± 0.13*	0.12 ± 0.01	0.49 ± 0.16	1.26 ± 0.10*	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.00*
170 µg/L	1.90 ± 0.08*	0.11 ± 0.01	0.54 ± 0.14	1.21 ± 0.09*	0.06 ± 0.02*	0.07 ± 0.01*
230 µg/L	2.03 ± 0.15*	0.13 ± 0.02	0.59 ± 0.23	1.25 ± 0.09*	0.06 ± 0.01*	0.09 ± 0.01*
380 µg/L	1.95 ± 0.05*	0.12 ± 0.02	0.56 ± 0.10	1.03 ± 0.20*	0.05 ± 0.02*	0.07 ± 0.00*

*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al grupo control.

proteínas, estos valores no son distintos respecto a los obtenidos para el grupo control de manera estadísticamente significativa.

Los niveles de **glucosa** determinados en las dafnias expuestas a procloraz aumentaron a todas las concentraciones de exposición con respecto al grupo control con significación estadística ($p < 0.05$). Como se observa en la Figura 27, los porcentajes respecto al grupo control aumentaron en promedio un 70 %.

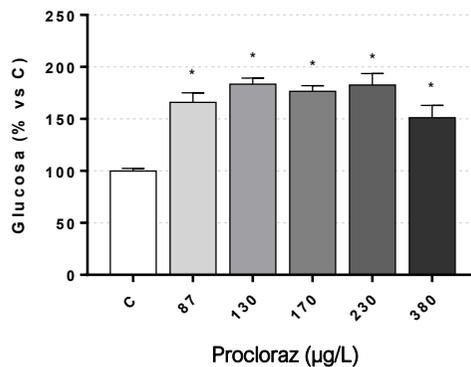


Figura 27.-Porcentaje de variación frente al control (C), de los niveles de glucosa en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del fungicida.
*Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$).

El contenido en lactato total disminuyó conforme la concentración de exposición aumentó (Figura 28). El análisis estadístico ANOVA puso de manifiesto que existían diferencias entre los diferentes grupos que componían el ensayo. El test *post-hoc* Dunnett indicó que dichas diferencias se encontraban en los grupos que habían sido expuestos a las mayores concentraciones, 170, 230 y 380 µg/L de procloraz, reduciéndose en promedio un 50 % respecto a los valores obtenidos para

el grupo control, llegando a ser máxima en la concentración más elevada (54 %).

La actividad **lactato deshidrogenasa (LDH)** aumentó en todas las dafnias independientemente de la concentración de exposición (Tabla 12). El análisis estadístico ANOVA y *post-hoc* Dunnett evidenciaron que todos los grupos ensayados mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control. Aunque en promedio este parámetro aumentó para todas las concentraciones de exposición en un 117 %, el mayor registro se obtuvo para la concentración de 230 $\mu\text{g/L}$, con un incremento próximo al 160 % (Figura 28).

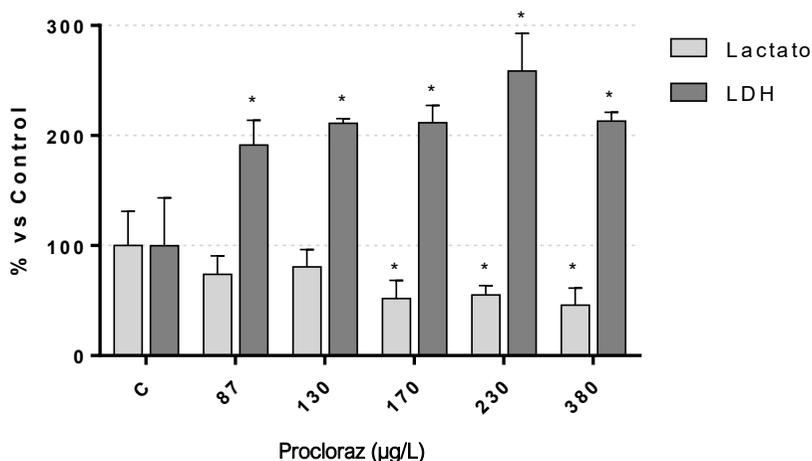


Figura 28.- Porcentaje de variación frente al control (C), del contenido lactato y LDH en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del fungicida. *Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$).

4.1.5 Expresión génica

4.1.5.1 Proteínas de choque térmico

Los resultados obtenidos muestran que tras 21 días solo en las dafnias expuestas a la concentración más elevada (380 $\mu\text{g/L}$), mostraron alterada la expresión del gen *hsp70* de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con un *fold-change* de 2, mientras que en *hsp90* no se produjeron alteraciones estadísticamente significativas (Figura 29).

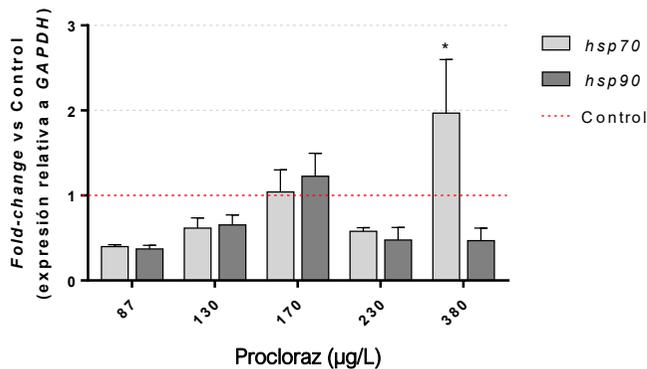


Figura 29.- Representación gráfica (media y SEM) de la expresión relativa de *hsp70* y *hsp90* respecto al gen de referencia *GAPDH* en dafnias expuestas 21 días a diferentes concentraciones del fungicida prochloraz. *Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$).

4.1.5.2 Metabolismo de lípidos

Para evaluar posibles alteraciones en la síntesis lipídica, se estudió la expresión del gen *fadb* en las dafnias expuestas a concentraciones crecientes del fungicida prochloraz frente al grupo control (Figura 30). El análisis ANOVA indicó que no existían diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los grupos expuestos al fungicida frente al grupo control.

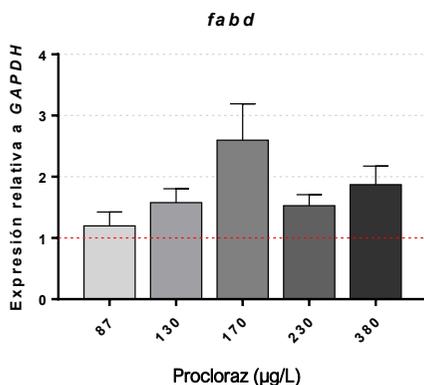


Figura 30.- Representación gráfica (media y SEM) de la expresión relativa de *fabd* respecto al gen de referencia *GAPDH* en dafnias expuestas a diferentes tratamientos del fungicida procloraz. (---) representa la media del grupo control.

4.1.5.3 Vitelogeninas

En la Figura 31 se muestran los resultados obtenidos para la expresión relativa de *vtg1* y *vtg2* respecto al gen de referencia *GAPDH* y frente al grupo control. Aunque los resultados muestran una tendencia a la sobreexpresión de ambos genes, el análisis estadístico ANOVA evidenció que no existían diferencias estadísticamente significativas en ninguno de ellos tras someter a las dafnias a los diferentes tratamientos con procloraz respecto al grupo control ($p > 0.05$).

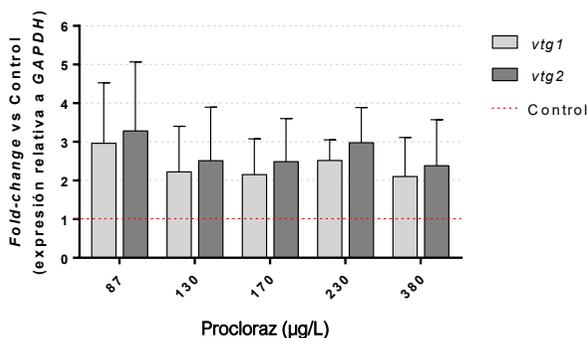


Figura 31.- Representación gráfica (media y SEM) de la expresión relativa de *vtg1* y *vtg2* respecto al gen de referencia *GAPDH* en dafnias tras 21 días de exposición a diferentes concentraciones del fungicida procloraz.

4.1.5.4 Estrés oxidativo

Para evaluar posibles alteraciones en rutas relacionadas con el estrés oxidativo producido por la presencia de fungicida en *D. magna*, se seleccionaron los genes *gst* y *cat*, y se estudió la expresión relativa de ambos respecto al gen de referencia *GAPDH*. En la Figura 32 se muestran los resultados obtenidos.

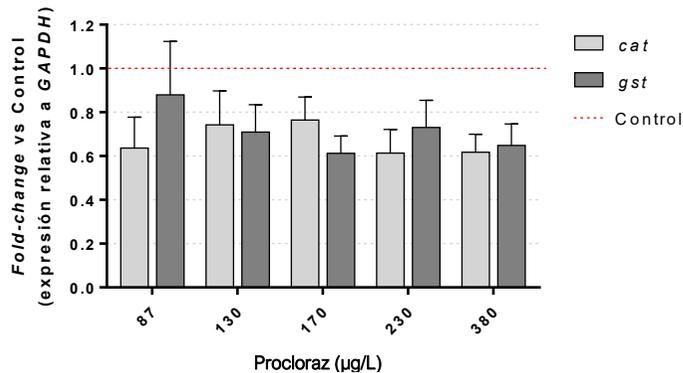


Figura 32.- Representación gráfica de la media y SEM de la expresión relativa de *cat* y *gst* respecto al gen de referencia *GAPDH* en dafnias expuestas a diferentes tratamientos del fungicida procloraz.

El análisis estadístico ANOVA indicó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos tratados con procloraz ($p > 0.05$).

4.1.5.5 Metalotioneínas

Para evaluar posibles alteraciones en rutas relacionadas con el metabolismo de los xenobióticos por la presencia de fungicida en *D. magna*, se seleccionaron los genes *mt-a*, *mt-b* y *mt-c*, y se estudió la expresión relativa de las tres metalotioneínas respecto al gen de referencia *GAPDH*. En la Figura 33 se muestran los resultados obtenidos.

El análisis estadístico ANOVA y *post-hoc* Dunnett evidenciaron que solo se produjeron alteraciones estadísticamente significativas para el gen *mt-b*, produciéndose un descenso en la expresión a las concentraciones de tóxico más bajas con un *fold-change* inferior a 0.5 (reducción de la expresión de un 50 %). Aunque también se observó una disminución en la expresión de *mt-b* en las concentraciones más altas, 230 y 380 $\mu\text{g/L}$, no resultaron ser estadísticamente significativas.

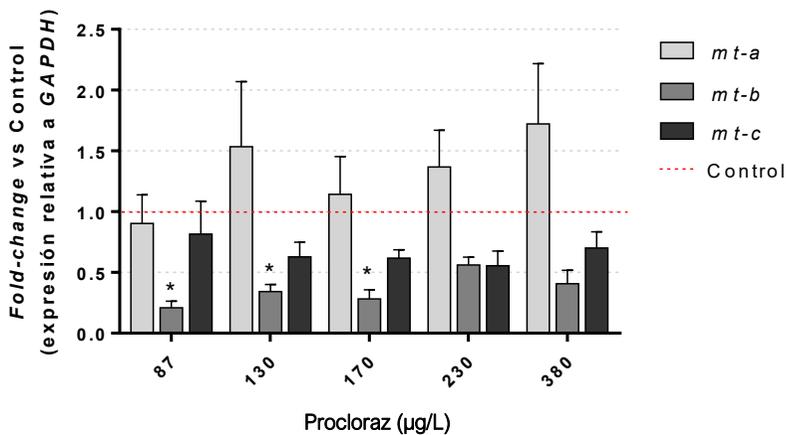


Figura 33.- Representación gráfica (media y SEM) de la expresión relativa de *mt-a*, *mt-b* y *mt-c* respecto al gen de referencia *GAPDH* en dafnias expuestas durante 21 días a diferentes concentraciones del fungicida prochloraz. * $p < 0.05$.

4.1.5.6 Hemoglobina

Los genes *hgb1* y *hgb2* que codifican para la síntesis de hemoglobina resultaron alterados por la exposición de las dafnias a prochloraz. Según se observa en la Figura 34 el gen *hgb1* se sobreexpresó en las dafnias de todos los grupos expuestos al fungicida, sin embargo, solo las concentraciones más altas, 170, 230 y 380 $\mu\text{g/L}$, fueron estadísticamente significativas con un *fold-change* promedio de 270 respecto a la

expresión en el grupo control. Para el gen *hgb2* la sobreexpresión fue estadísticamente significativa en todos los casos ($p < 0.05$). El test *post-hoc* (Dunnett) evidenció que todas las concentraciones presentaban diferencias respecto al grupo control, con un *fold-change* promedio cercano a 50.

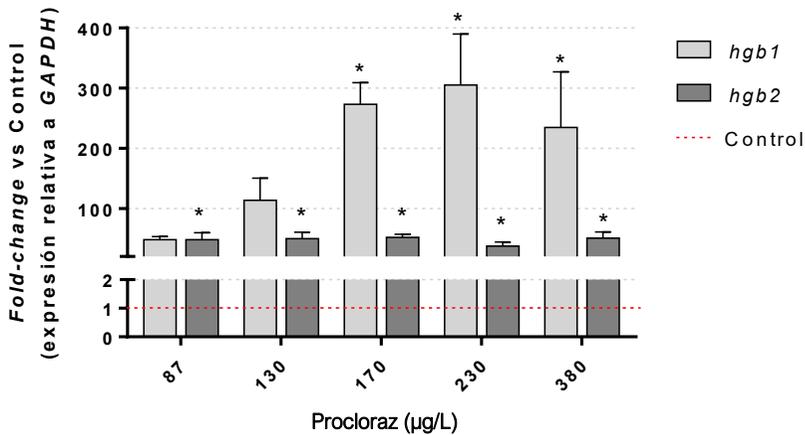


Figura 34.- Representación gráfica (media y SEM) de la expresión relativa de *hgb1* y *hgb2* respecto al gen de referencia *GAPDH* en dafnias expuestas durante 21 días a diferentes concentraciones del fungicida prochloraz. * $p < 0.05$.

4.1.6 Resumen resultados prochloraz

A continuación, se muestra un cuadro resumen (Figura 35) de los principales resultados obtenidos en los diferentes ensayos realizados en *D. magna* con el fungicida prochloraz a diferentes concentraciones.

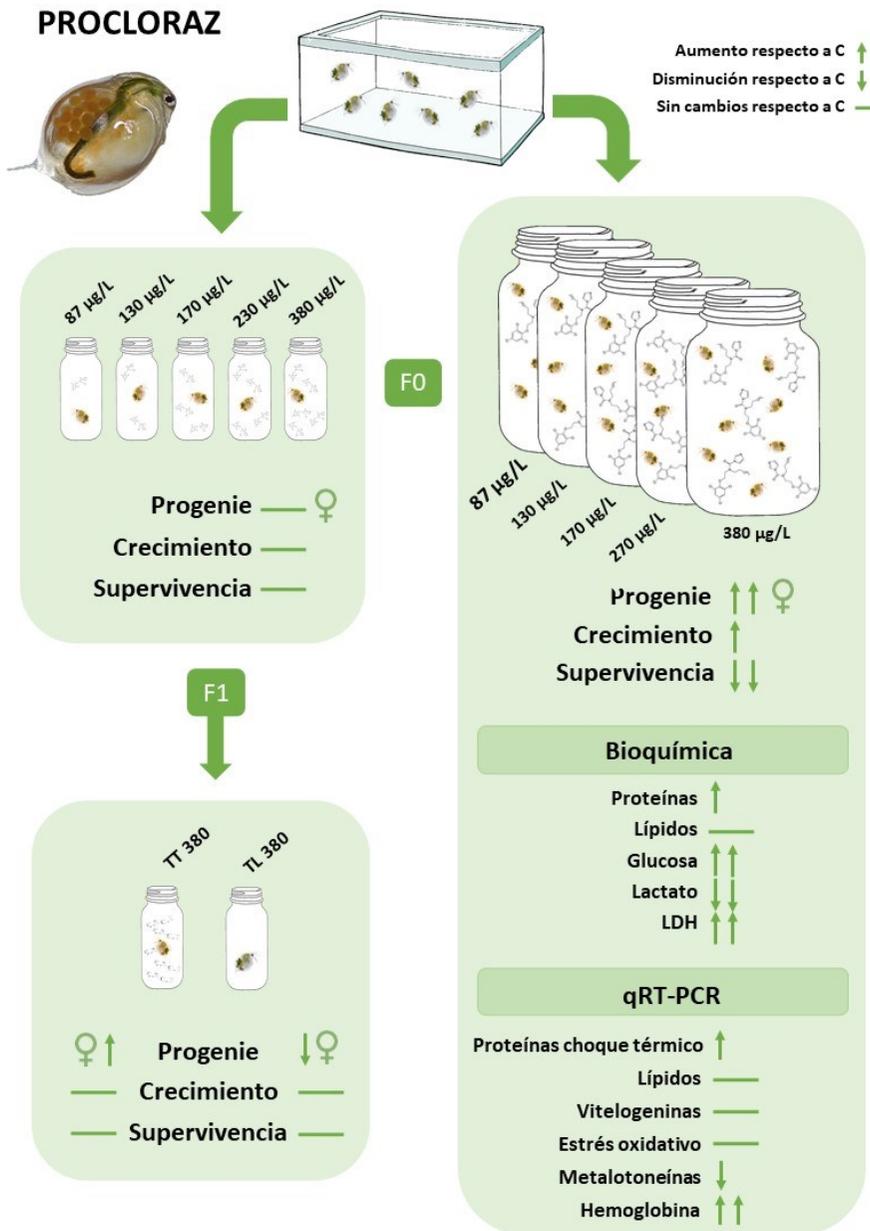


Figura 35.- Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos realizados en *D. magna* expuestas al fungicida procloraz.

4.2 Insecticida piriproxifen

4.2.1 Toxicidad aguda

En la Tabla 13 se muestran las concentraciones testadas para el insecticida piriproxifen y los porcentajes obtenidos de inmovilización a cada uno de los tiempos de exposición, 24 y 48 horas. También se refleja el cálculo de la CE_{50} y los límites de confianza a ambos tiempos de exposición. Las concentraciones ensayadas fueron 50, 260, 440, 780 y 1000 $\mu\text{g/L}$ para el ensayo a 24 horas, y 50, 150, 260, 440 y 780 $\mu\text{g/L}$ para el de 48 horas. Piriproxifen causó un aumento de la inmovilización en las dafnias al aumentar el tiempo de exposición, pues el valor obtenido para 48 horas resultó ser inferior (336.477 $\mu\text{g/L}$), lo que implicaría un aumento de la toxicidad respecto de 24 horas (479.804 $\mu\text{g/L}$). Con ello, la concentración necesaria para causar el 50 % de inmovilización de los individuos resultó ser un 30 % inferior a 48 horas que a 24.

Tabla 13.- Concentraciones testadas de piriproxifen en *D. magna*, porcentajes (%) de inmovilización, y cálculo de la CE_{50} y límites de confianza a diferentes tiempos de exposición.

24 horas		48 horas	
Concentración ($\mu\text{g/L}$)	% Inmovilización	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	% Inmovilización
50	3	50	13
260	26	150	30
440	66	260	46
780	76	440	73
1000	86	780	86
$CE_{50} = 479.804 \mu\text{g/L}$ [388.382 – 568.962]		$CE_{50} = 336.477 \mu\text{g/L}$ [262.699 – 416.515]	

En las Figuras 36 y 37, donde se muestra la representación gráfica de los porcentajes de inmovilización frente a las diferentes concentraciones testadas, puede observarse como la dosis-dependencia tiene una relación lineal. La correlación lineal (r^2) entre ambas variables fue de 0.88 y 0.92 para 24 y 48 horas respectivamente.

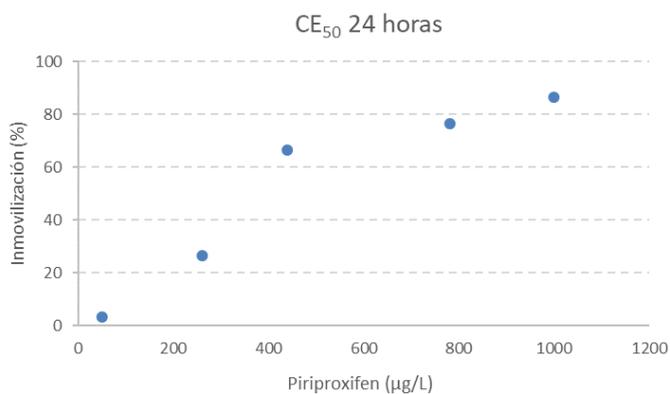


Figura 36.- Representación gráfica de los resultados obtenidos para la CE_{50} del insecticida piriproxifen a las 24 horas de exposición aguda en neonatos de *D. magna*.

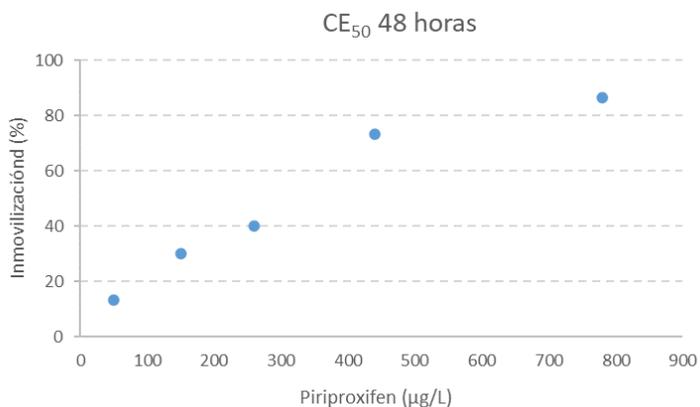


Figura 37.- Representación gráfica de los resultados obtenidos para la CE_{50} del insecticida piriproxifen a las 48 horas de exposición aguda en neonatos de *D. magna*.

4.2.2 Efecto sobre el comportamiento alimenticio

Como se indicó en el apartado 3.4 de Material y Métodos, neonatos procedentes de la colonia fueron expuestos durante 5 horas al insecticida piriproxifen, empleando las mismas concentraciones que posteriormente se usarán en los ensayos de toxicidad crónica, con la finalidad de evaluar si producían alguna alteración sobre la capacidad de ingesta o filtración del alga *Nannochloris oculata* por parte de los individuos.

La exposición a piriproxifen no causó ningún efecto sobre los parámetros de filtración e ingestión derivado de la exposición (Figura 38), pues el análisis ANOVA no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las concentraciones ensayadas frente al grupo control.

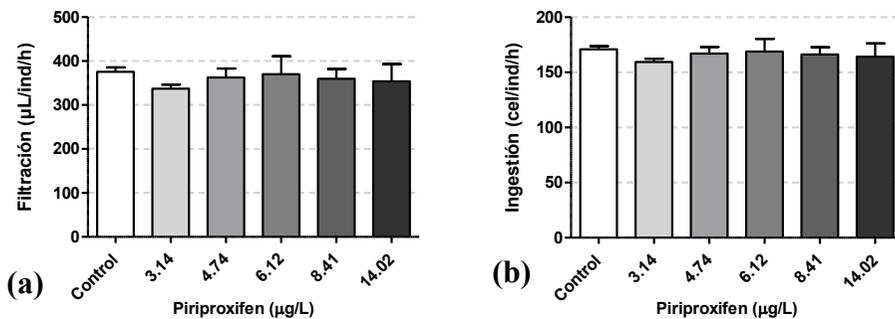


Figura 38.- Tasas de filtración (a) e ingestión (b) del alga *N. oculata* por parte de *D. magna* expuesta durante 5 horas a diferentes concentraciones subletales del insecticida piriproxifen.

4.2.3 Toxicidad crónica

En el estudio de la toxicidad crónica se siguió el protocolo reflejado en el apartado de Material y Métodos 3.5.1. Las concentraciones subletales en los ensayos de la generación F0 a las que se expusieron cada uno de los grupos, corresponden a las mismas fracciones equivalentes de la CE₅₀ a 48 horas 1/107, 1/71, 1/55, 1/40 y 1/24, que se emplearon para los estudios del fungicida procloraz, como se indicó en el apartado 3.5.1. Las concentraciones equivalentes en µg/L se recogen en la Tabla 3 del mismo apartado. En el ensayo crónico generación F1, se empleó únicamente la fracción de CE₅₀ más alta, 1/24 (14.02 µg/L). A lo largo del ensayo se registraron datos de todos los parámetros indicados en el apartado 3.5.1 para la evaluación del efecto tóxico sobre el crecimiento y la reproducción de los individuos.

4.2.3.1 Exposición individual generación F0. Test de reproducción de *D. magna*

Durante la ejecución del estudio de toxicidad crónica se registraron tanto datos de supervivencia como de reproducción a lo largo de los 21 días de duración del ensayo. Finalizado el estudio, se fotografiaron todos los individuos para posteriormente realizar las distintas mediciones. En la Figura 39 se muestra una dafnia perteneciente al grupo control, y una dafnia procedente de la concentración más alta ensayada, 14.02 µg/L a los 21 días. Como se verá más adelante, los individuos que se expusieron a las diferentes concentraciones de piriproxifen alcanzaron un tamaño significativamente inferior a los individuos del grupo control. Además, el número de descendencia se redujo drásticamente.

En el análisis externo de los animales, se observó que el patrón de coloración se alteró en los individuos expuestos al insecticida, pasando de tener una tonalidad parda en las dafnias, a ser rosa anaranjada en las dafnias expuestas al insecticida.

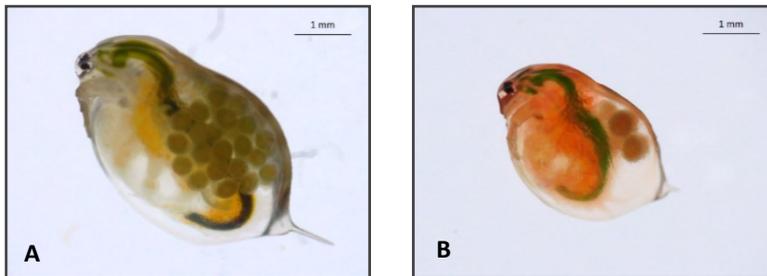


Figura 39.- Dafnias del experimento crónico individual F0 a 21 días. **A:** hembra control del experimento crónico con piriproxifen con un fenotipo propio de un individuo normal a los 21 días de edad. Imagen **B:** hembra tras 21 días de tratamiento con piriproxifen a una concentración de 14.02 $\mu\text{g/L}$. Se observa una reducción en el tamaño, número de huevos, y alteración general en la coloración. Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico, aumentos 30x.

En la Tabla 14 se recogen los valores obtenidos de los parámetros analizados en este ensayo. Todas las dafnias del experimento llegaron al último día de ensayo (21 días), con lo que la longevidad no se vio afectada por el insecticida piriproxifen. El resto de parámetros individuales y poblacionales sí se vieron alterados.

El **tamaño de la camada** se redujo ya con la concentración más baja de tóxico un 80 % (3.14 $\mu\text{g/L}$), hasta alcanzar casi un 90 % en la más alta, 14.02 $\mu\text{g/L}$. El análisis estadístico de la varianza mediante el test ANOVA y test *post-hoc* Dunnett pusieron de manifiesto que dichas diferencias eran estadísticamente significativas entre el grupo control y todos los grupos tratados ($p < 0.05$).

Tabla 14.- Valores medios y desviaciones típicas de los parámetros estudiados en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones de piriproxifen durante 21 días.

Tratamiento	Tamaño de la camada	Nº de camadas	Tiempo a la primera puesta (días)	Nº de neonatos por hembra	Longevidad (días)	Longitud corporal (mm)
Control	23.52 ± 1.51	5.07 ± 0.13	7.80 ± 0.4	119.33 ± 9.49	21.00 ± 0.00	4.30 ± 0.13
3.14 µg/L	4.68 ± 0.30*	3.40 ± 0.25*	12.60 ± 0.44*	15.87 ± 1.07*	21.00 ± 0.00	3.57 ± 0.11*
4.74 µg/L	4.31 ± 1.07*	3.07 ± 0.13*	13.07 ± 0.39*	13.20 ± 3.09*	21.00 ± 0.00	3.54 ± 0.15*
6.12 µg/L	3.74 ± 0.24*	3.07 ± 0.25*	13.20 ± 0.54*	11.60 ± 1.16*	21.00 ± 0.00	3.55 ± 0.03*
8.41 µg/L	3.29 ± 0.18*	2.67 ± 0.21*	14.27 ± 0.65*	8.86 ± 0.69*	21.00 ± 0.00	3.52 ± 0.07*
14.02 µg/L	2.60 ± 0.15*	2.73 ± 0.25*	13.87 ± 0.78*	7.20 ± 0.83*	21.00 ± 0.00	3.37 ± 0.07*

*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al grupo control.

Se determinó la existencia de correlación lineal estadísticamente significativa entre la concentración de insecticida y el tamaño de la camada con r^2 de 0.94, indicativo de que este parámetro se alteró de manera dosis-dependiente. En la Figura 40 se representan gráficamente los valores obtenidos como porcentaje respecto al grupo control.

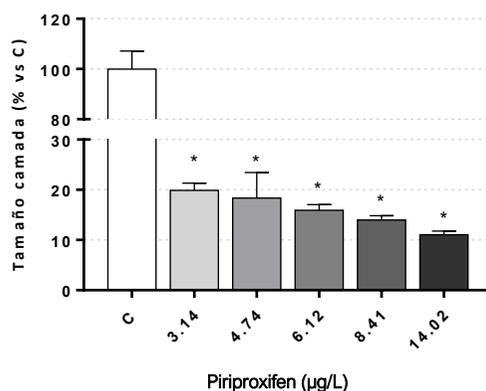


Figura 40.- Porcentaje de variación frente al control (C), de los valores del tamaño de la camada determinados en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del insecticida. * $p < 0.05$.

La CE_{50} para este parámetro no fue determinada ya que la concentración más baja ya provocó un descenso superior al 50 % respecto a los datos obtenidos para el grupo control, lo que imposibilitó su cálculo sin recurrir a la extrapolación.

El **número de camadas** se alteró en todas las dafnias expuestas a las diferentes concentraciones de tóxico respecto al grupo control. El análisis estadístico mostró que las diferencias entre los tratamientos y el control eran estadísticamente significativas. Mientras que el grupo control tuvo en promedio 5 camadas, en la concentración más baja ensayada (3.14 µg/L) este parámetro se redujo a 3-4 (disminución del 33

%), llegando a solo 2-3 camadas en la concentración ensayada más alta (14.02 $\mu\text{g/L}$), conllevando una disminución casi del 50 % en promedio respecto al grupo control. En la Figura 41 se representan los porcentajes obtenidos respecto al grupo control de este parámetro para cada una de las concentraciones ensayadas.

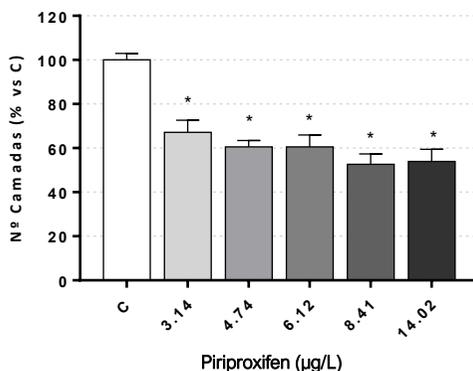


Figura 41.- Porcentaje de variación frente al control (C), de los valores del nº de camadas determinados en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del insecticida. * $p < 0.05$.

Aunque la relación dosis-respuesta parece que sigue una tendencia lineal, al estudiar la correlación entre ambas variables (concentración y tamaño de la camada) no resultó ser estadísticamente significativa. Para este parámetro sí fue posible determinar la CE_{50} resultando en 11.2 $\mu\text{g/L}$, con una r^2 de 0.74.

El parámetro **tiempo a la primera puesta** también se alteró por la exposición al insecticida para todas las concentraciones testadas. En la Figura 42 se representan porcentualmente los datos obtenidos para este parámetro respecto al grupo control. La primera puesta en el grupo tuvo lugar el día 8, mientras que la concentración de 3.14 $\mu\text{g/L}$ se retrasó hasta el día 12, llegando hasta los 14 días en las dafnias expuestas a las concentraciones de 8.41 y 14.02 $\mu\text{g/L}$, lo que supuso un aumento del

tiempo del 60 % en la concentración más baja, hasta casi alcanzar un 80 % en la más alta.

El análisis ANOVA evidenció que estas diferencias eran estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a todas las concentraciones ensayadas de piriproxifen al compararlas con el grupo control.

Al igual que el parámetro número de camadas, a pesar de observarse una relación entre la concentración y la demora en la primera puesta, la correlación lineal tampoco resultó estadísticamente significativa. El cálculo de la CE_{50} determinó que el valor para este parámetro fue de 3.26 $\mu\text{g/L}$ con una r^2 de 0.82.

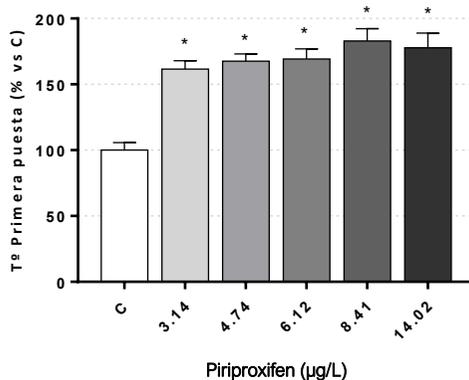


Figura 42.- Porcentaje de variación frente al control (C), de los valores del tiempo a la primera puesta determinados en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del insecticida. * $p < 0.05$.

El **nº total de neonatos por hembra** es el parámetro que más descendió, desde un 87 % en el caso de las dafnias expuestas a la concentración ensayada más baja, 3.14 $\mu\text{g/L}$, al 94 % en la concentración más alta testada, 14.02 $\mu\text{g/L}$. Los datos obtenidos se representan gráficamente en la Figura 43 como porcentaje respecto al grupo control.

El análisis estadístico ANOVA y test *post-hoc* Dunnett mostraron que todos los grupos presentan una diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$).

Este parámetro mostró una buena correlación lineal dosis-dependiente. Resultó estadísticamente significativo con una r^2 de 0.88. Sin embargo, debido a que la concentración más baja ya causó una reducción muy por encima del 50 % respecto al valor obtenido en el grupo control, el cálculo de la CE_{50} para este parámetro tampoco fue posible.

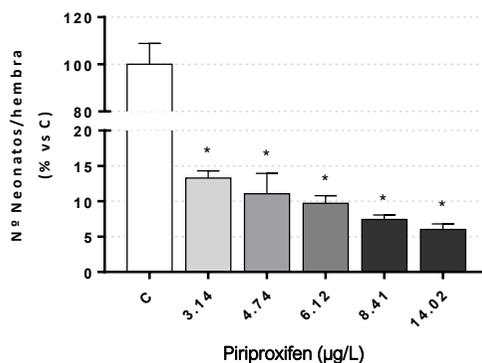


Figura 43.- Porcentaje de variación frente al control (C), del nº de neonatos por hembra determinados en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del insecticida. * $p < 0.05$

Respecto a la **longitud corporal**, como puede observarse en la Figura 44 (% respecto al grupo control), se vio alterada en todas las concentraciones testadas, produciendo una reducción en el tamaño de los individuos tratados comprendida entre el 17 % en el caso de la concentración de 3.14 µg/L, y un 23 % para 14.02 µg/L. El análisis de la varianza (ANOVA) mostró diferencias estadísticamente significativas con un p -valor inferior a 0.0001, evidenciando el test *post-hoc* Dunnett

que dichas diferencias se encontraban todas las dafnias expuestas a piriproxifen frente a las dafnias control.

La correlación lineal entre la concentración de exposición y la longitud corporal alcanzada por los individuos al finalizar el ensayo resultó estadísticamente significativa ($r^2 = 0.87$).

Por otra parte, la relación de la longitud de la espina caudal respecto a la longitud corporal se vio reducida un 55 % en promedio de forma estadísticamente significativa en todos los tratamientos respecto al grupo control.

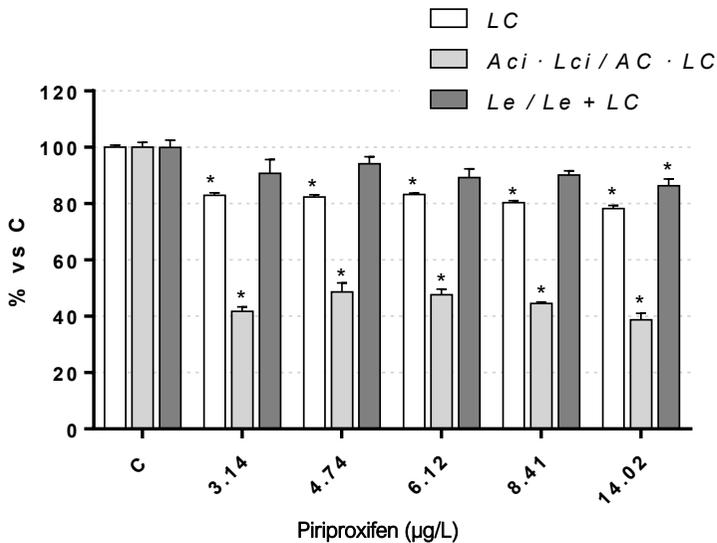


Figura 44.- Porcentaje de variación frente al control (C) y entre tratamientos, de la longitud corporal (LC), proporción cámara incubadora (Aci-Lci) respecto al tamaño corporal (AC-LC), y proporción espina caudal (Le) respecto a la longitud total (Le+LC) en *D. magna* en el ensayo F0 con piriproxifen. *Diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p < 0.05$).

La relación tamaño de la cámara incubadora / tamaño del individuo, disminuyó en las dafnias expuestas a la concentración más elevada de exposición al insecticida respecto al grupo control, con un descenso promedio del 12 %. En la Figura 44 se representan las tres mediciones realizadas como porcentaje respecto al grupo control.

La Figura 45 representa los valores obtenidos para la **tasa intrínseca de crecimiento natural** como porcentajes respecto al grupo control. Los valores absolutos están comprendidos entre 0.32 para el grupo control, y 0.11 para la concentración más alta ensayada del insecticida piriproxifen (14.02 $\mu\text{g/L}$). El análisis de la varianza (ANOVA) mostró diferencias estadísticamente significativas con un p-valor inferior a 0.0001. El test *post-hoc* Dunnett mostró que dichas diferencias se encontraban en todas las dafnias expuestas a piriproxifen frente a las dafnias control.

Se observó un descenso en el parámetro inversamente proporcional al aumento de las concentraciones, partiendo el valor para r en 0.16 para la concentración de 3.14 $\mu\text{g/L}$, y finalizando en 0.11 para 14.02 $\mu\text{g/L}$ de piriproxifen, suponiendo una reducción del 50 al 65 % respectivamente.

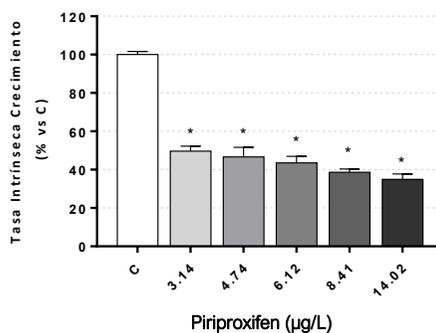


Figura 45.- Medias \pm SEM de la tasa intrínseca de crecimiento natural del ensayo crónico OECD para el piriproxifen. (*) Diferencias estadísticas ($p < 0.0001$) de los tratamientos respecto al grupo control.

El coeficiente de correlación de Pearson puso de manifiesto la existencia de dependencia lineal entre las variables concentración y tasa intrínseca de crecimiento natural ($R^2 = 0.80$; $p < 0.05$). El cálculo de la CE_{50} para el parámetro poblacional fue de $4.99 \mu\text{g/L}$ con una r^2 de 0.81.

Análisis morfológico de las camadas

Los neonatos de la segunda camada en adelante fueron recolectados y preservados en etanol absoluto para su análisis en el microscopio estereoscópico, excepto los destinados a realizar el ensayo en la generación F1 (ausencia vs exposición al insecticida). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 15. Se analizó la totalidad de individuos recolectados. En el caso del grupo control, se seleccionaron 50 individuos de cada día al azar para su análisis. Cada individuo se observó para determinar su sexo, y la presencia/ausencia de malformaciones. Como se refleja en la Tabla 15, en el grupo control todos los neonatos fueron hembras con morfología acorde a su estado de desarrollo.

Los neonatos procedentes de madres tratadas, independientemente de la concentración de exposición, fueron mayoritariamente machos. Respecto a las malformaciones, el 100 % presentó algún tipo de anomalía. Aquellos que quedaron excluidos de la determinación de sexo fue debido a que presentaban un estadio de desarrollo temprano, imposibilitando la diferenciación del sexo del individuo.

Tabla 15.- Resultados obtenidos en el análisis de los neonatos del ensayo crónico de dafnias expuestas a piriproxifen. Se indica el nº total de neonatos analizados por tratamiento, y el porcentaje (%) de hembras, de machos, y de malformaciones encontradas en cada grupo analizado. Entre paréntesis se indica el % de individuos excluidos en la determinación del sexo.

Grupo	Total individuos	Malformados (%)	Sexo	
			Hembras (%)	Machos (%)
Control	200	0	100	0
3.14 µg/L	39	100	5	95
4.72 µg/L	45	100	2.5	97.5
6.12 µg/L	33	100 (6)	2.5	97.5
8.41 µg/L	22	100 (9)	0	100
14.02 µg/L	13	100 (7)	15	85

En la Figura 46 se muestra una fotografía de neonatos macho procedentes del ensayo. En ella se señala la presencia del primer par antenal elongado, dimorfismo sexual en esta especie en individuos inferiores a 24 horas de vida que permite realizar la diferenciación de sexos según la OECD 211. También se observa la leve malformación en la espina caudal (no extendida por completo) que prevaleció en todos los individuos expuestos a piriproxifen, excepto aquellos que presentaron un estadio de desarrollo temprano, en los cuales la espina caudal se encontraba completamente plegada.



Figura 46.- Individuos neonatos de dafnia procedentes de madres (F0) expuestas al insecticida piriproxifen. Las flechas señalan la localización del primer par antenal, indicativo de que se trata de individuos macho. Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico, aumentos 55x.

4.2.3.2 Exposición individual generación F1: ausencia vs presencia del plaguicida

Como se explicó en el apartado 3.5.2, para llevar a cabo este estudio, la selección de neonatos F1 procedentes de madres expuestas (F0) a la concentración más elevada de piriproxifen se realizó de forma aleatoria. Las hembras presentes en cada subgrupo fueron empleadas para el estudio de los diferentes parámetros reproductivos (tamaño de la camada, número de camadas, tiempo a la primera puesta, número total de neonatos por hembra). Los parámetros longevidad y longitud se analizaron para cada sexo por separado.

Para diferenciar los grupos, como se indicó en material y métodos, se empleará la abreviación “TT 14.02” (tratado/tratado) para aquel grupo que vuelve a someterse a las mismas condiciones de procedencia, y “TL 14.02” (tratado/libre de insecticida) para el que se establece en medio exento de tóxico. En el caso del grupo TL 14.02, el número de hembras presentes fue de $n = 3$, y en el grupo TT 14.02 de $n = 4$, siendo machos

el resto de los neonatos. Para poder realizar la estadística de forma más equilibrada, en lugar de escoger las 15 hembras del grupo control, se seleccionaron 4 al azar (equivalente al máximo número de hembras encontrada en el grupo TT). En el caso de los machos, el análisis estadístico se realizó entre ambos grupos tratados.

La Figura 47 muestra las fotografías de individuos adultos (hembras y machos) al finalizar el experimento. La determinación de machos se realizó en base al tamaño del individuo adulto al finalizar el ensayo (apartado 1.3.2), la elongación del primer par antenal (PA), y la forma de las valvas (en las hembras, las valvas son simétricas y redondeadas, mientras que, en el macho, la parte superior (VA) forma casi un ángulo de 90°). En la Tabla 16 se resumen los valores medios obtenidos y las desviaciones típicas para todos los parámetros analizados en este ensayo.

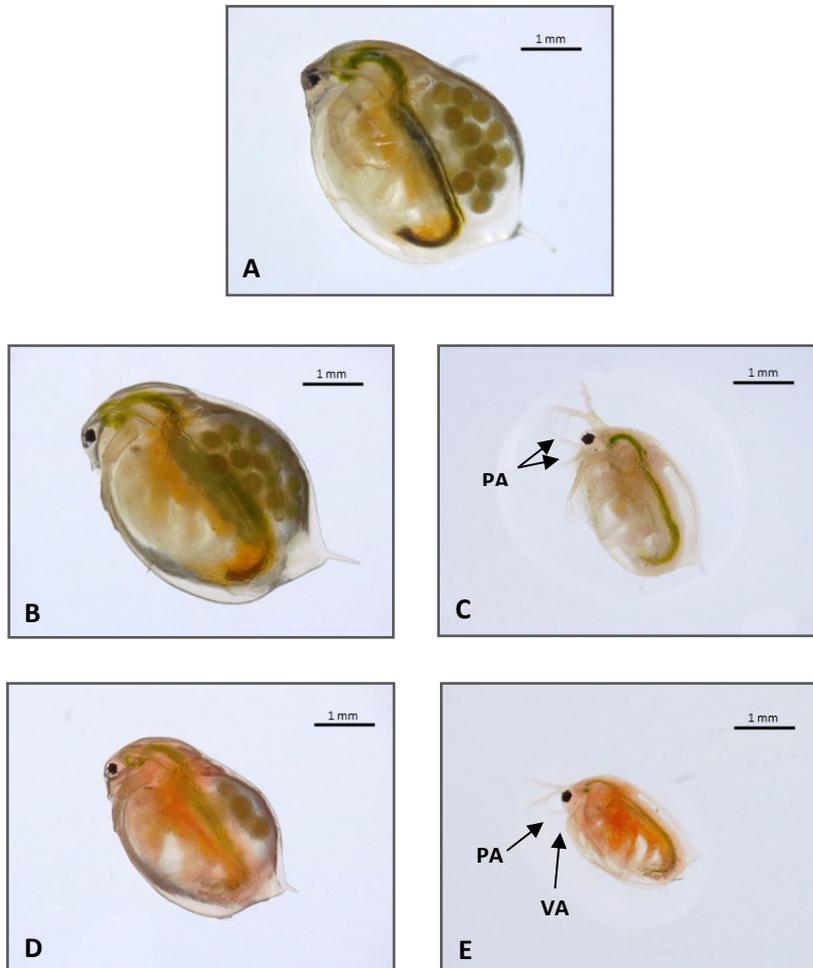


Figura 47.- Individuos F1 de 21 días procedentes de madres F0 expuestas a piriproxifen ($14.02 \mu\text{g/L}$). **A:** dafnia hembra del grupo control. **B:** dafnia hembra del grupo TL. **C:** dafnia macho del grupo TL. **D:** dafnia hembra del grupo TT. **E:** dafnia macho del grupo TT. PA: par antenal elongado en los individuos macho. VA: valvas asimétricas en el macho. Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico, aumentos 30x.

Tabla 16.- Valores medios y desviaciones típicas de los parámetros estudiados en *D. magna* en el ensayo de recuperación vs presencia de piriproxiifen durante 21 días de la generación F1.

Tratamiento	Sexo	Tamaño de la camada	Nº de camadas	Tiempo a la primera puesta (días)	Nº de neonatos por hembra	Longevidad (días)	Longitud corporal (mm)
Control	Hembras	20.06 ± 4.10	4.93 ± 0.26	7.40 ± 0.51	98.93 ± 20.93	21.00 ± 0.00	4.30 ± 0.27
TL 14.02 µg/L	Hembras	22.17 ± 3.88	4.00 ± 0.00*	10.67 ± 0.58*	88.67 ± 15.50	21.00 ± 0.00	4.23 ± 0.10
	Machos	-	-	-	-	-	2.63 ± 0.09
TT 14.02 µg/L	Hembras	2.71 ± 0.35*§	2.25 ± 0.50*§	14.25 ± 1.50*§	6.00 ± 0.82*§	21.00 ± 0.00	3.30 ± 0.05*§
	Machos	-	-	-	-	-	2.20 ± 0.04§

*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al grupo control.

§Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

El análisis de todos los parámetros se llevó a cabo mediante el estudio de la varianza (ANOVA) con el fin de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, y posteriormente se realizó el test *post hoc* Tukey para reflejar entre qué grupos existían dichas diferencias.

Tras analizar todos los parámetros, se observó como la retirada del insecticida (grupo TL) permitió una clara recuperación de los individuos, llegando en algunos de los parámetros individuales a valores equivalentes a los obtenidos para el grupo control.

Respecto al **tamaño de la camada**, el análisis *post-hoc* Tukey evidenció que las diferencias se encontraban entre el grupo control y el grupo TT 14.02 (medio con plaguicida), reflejando un descenso del parámetro en promedio de un 87 %. En la Figura 48 se representan gráficamente los valores obtenidos para el tamaño de la camada como porcentajes respecto al grupo control.

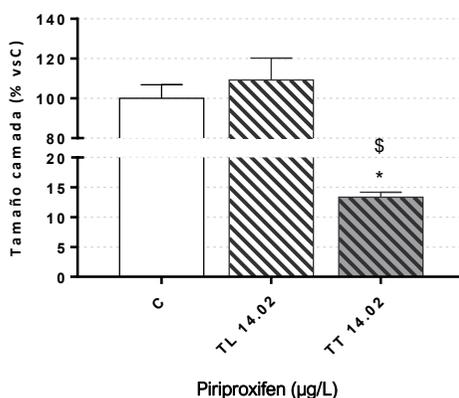


Figura 48.- Porcentaje de variación frente al control (C) y entre tratamientos, de los valores del tamaño de la camada determinados en *D. magna* en el ensayo con F1. *Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$). §Diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$).

En el caso del grupo TL 14.02 (medio libre de plaguicida) los resultados no mostraron diferencia respecto al grupo control, poniendo de manifiesto que la recuperación para este parámetro fue completa una vez los organismos dejaron de estar en presencia del piriproxifen. Sí se registraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos TT 14.02 y TL 14.02.

En cuanto al **número de camadas**, ambos grupos presentaron diferencias respecto a los valores obtenidos para el grupo control. Sin embargo, mientras que en el caso del grupo TT este valor se redujo en un 55 % en promedio, el grupo TL 14.02 solo experimentó un descenso del 19 %, lo que supuso una recuperación de casi el 60 % en las dafnias al eliminar el factor exposición al tóxico. Los valores obtenidos para el parámetro número de camadas se representan gráficamente en la Figura 49 como porcentajes respecto al grupo control.

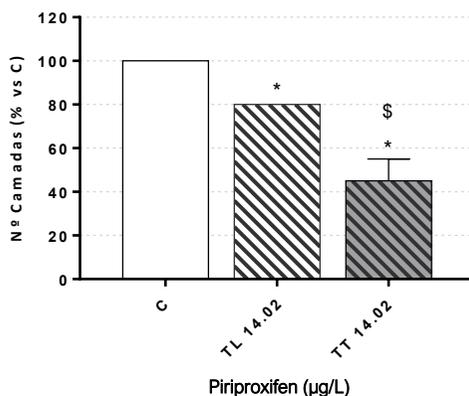


Figura 49.- Porcentaje de variación frente al control (C) y entre tratamientos, de los valores del nº de camadas determinados en *D. magna* en el ensayo con F1.
 *Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$).
 †Diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$).

El análisis de la varianza y *post hoc* Tukey pusieron de manifiesto que, para el **tiempo a la primera puesta**, tanto en el grupo que se mantuvo en las mismas condiciones de procedencia (TT) como el que estuvo en medio libre de plaguicida (TL), siguió viéndose un retraso respecto al grupo control. En la Figura 50 se representan porcentualmente los valores obtenidos respecto al grupo control.

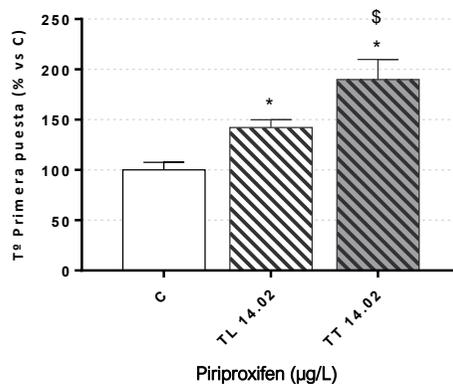


Figura 50.- Porcentaje de variación frente al control (C) y entre tratamientos, de los valores tiempo a la primera puesta en *D. magna* en el ensayo con F1.

*Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$).

§Diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$).

En el caso de los individuos que se mantuvieron en el medio con insecticida, este retraso duplicó el tiempo a la primera puesta, ya que para el grupo control este parámetro fue en promedio 7 días, mientras que para el grupo TT se retrasó hasta los 14. El grupo que se transfirió a medio sin plaguicida mostró un retraso respecto al grupo control en este parámetro, pero en este caso solo se redujo a 10 días en promedio, lo que supuso una recuperación del 40 % en este parámetro al eliminar la exposición al insecticida.

El parámetro **número de neonatos por hembra** mostró diferencias entre los tratamientos y entre el grupo TT y el grupo control ($p < 0.05$). El grupo TT 14.02 mostró una reducción en este parámetro del 94 %, mientras que el grupo TL 14.02 no resultó estadísticamente significativo, indicativo de que este parámetro se vio recuperado completamente al eliminar la exposición al tóxico. Los resultados obtenidos se representan gráficamente en la Figura 51 como porcentajes respecto al grupo control.

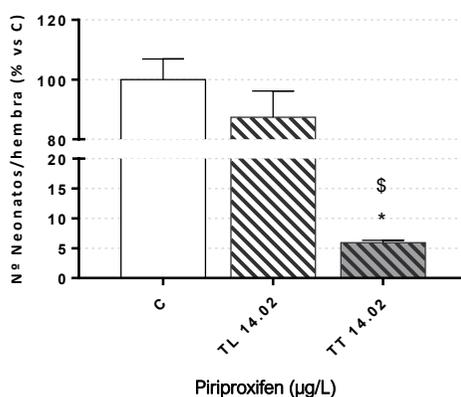


Figura 51.- Porcentaje de variación frente al control (C) y entre tratamientos, de los valores del nº de neonatos por hembra determinados en *D. magna* en el ensayo con F1. * Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$). [§]Diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$).

La **longevidad** de las dafnias no se vio comprometida en ningún caso, llegando a los 21 días la totalidad de individuos, tanto hembras como machos.

El parámetro **longitud corporal** se alteró en el grupo que continuaba expuesto al insecticida. Los resultados obtenidos se muestran porcentualmente respecto al grupo control en la Figura 52 para las hembras, y Figura 53 para los machos.

El análisis ANOVA y *post-hoc* Tukey mostró que las hembras TL alcanzaron tras los 21 días de duración del experimento el mismo tamaño que las pertenecientes al grupo control, por lo que este parámetro no resultó afectado en el desarrollo de las dafnias una vez eliminada la presencia del tóxico. Contrariamente, las hembras TT sufrieron en promedio una disminución del tamaño del 23 %.

Al estudiar la relación entre el tamaño de la cámara incubadora y el tamaño de las hembras, se observó que las expuestas de nuevo al insecticida vieron reducida la proporción respecto al grupo control en un 17 %, mientras que las que se encontraban en medio exento de plaguicida obtuvieron proporciones equivalentes a las del grupo control. El tamaño de la espina caudal en proporción a la longitud corporal también se vio reducida en los individuos expuestos de nuevo a piriproxifen (proporción un 47 % inferior a la de los grupos control y TL).

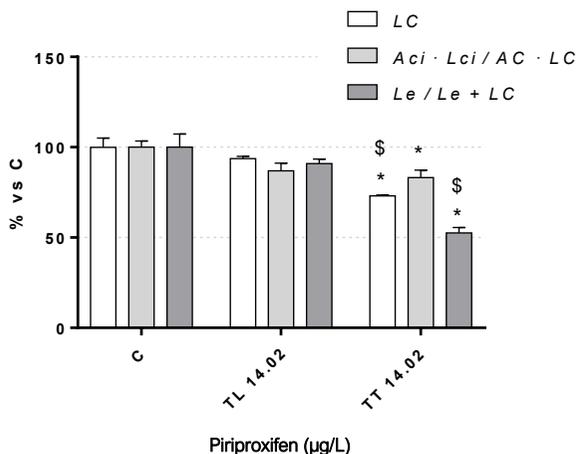


Figura 52.- Porcentaje de variación frente al control (C) y entre tratamientos, de la longitud corporal (LC), proporción cámara incubadora (Aci·Lci) respecto al tamaño corporal (AC·LC), y proporción espina caudal (Le) respecto a la longitud total (Le+LC) en *D. magna* en el ensayo F1 con piriproxifen. *Diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p < 0.05$). [§]Diferencias entre tratamiento ($p < 0.05$).

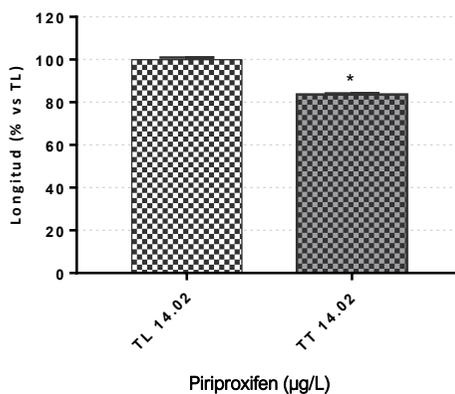


Figura 53.- Medias \pm SEM de la longitud de los machos como % respecto al grupo TL del ensayo crónico OECD de recuperación para el piriproxifen. (*) Indica las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los tratamientos.

Para el cálculo de la **tasa intrínseca de crecimiento natural**, solo se tuvieron en cuenta los individuos hembra, al igual que para el resto de parámetros reproductivos. Los datos obtenidos se representan gráficamente como porcentaje respecto al grupo control en la Figura 54.

El análisis estadístico ANOVA y *post-hoc* Tukey mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos del ensayo, evidenciando una recuperación superior al 65 % del grupo TL frente al grupo TT. Sin embargo, en el cálculo de este parámetro solo se tuvieron en cuenta las hembras. Al no reflejarse la proporción que éstas suponen respecto a cada uno de los grupos experimentales (aproximadamente un 25 % en ambos casos), el parámetro no refleja la capacidad real reproductiva de la población ensayada, debiendo ser inferior a la obtenida.

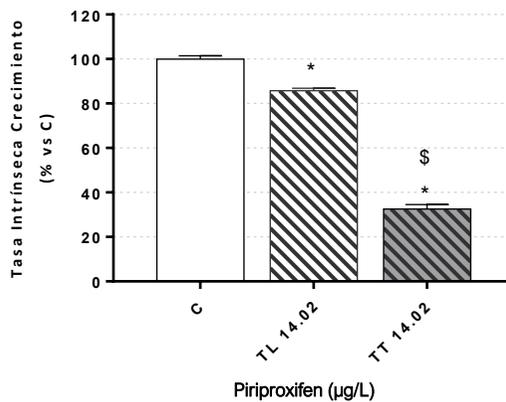


Figura 54.- Porcentaje de variación frente al control (C) y entre tratamientos, de los valores de la tasa intrínseca de crecimiento natural determinados en *D. magna* en el ensayo con F1. *Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$). §Diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$).

Análisis morfológico de las camadas

Debido al bajo número de individuos recolectados, todos los neonatos que integraron cada uno de los subgrupos (TL/TT) fueron analizados conjuntamente. En el caso del grupo control se procedió de la misma forma que en los ensayos anteriores, analizando una muestra de 50 individuos por día. Tanto en las puestas de las hembras del grupo control ($n = 200$) como en las puestas procedentes de las 3 hembras adultas del grupo TL ($n = 167$), toda la descendencia estuvo integrada por neonatos hembra con morfología externa normal.

En el grupo TT ($n = 17$) todos los individuos tuvieron la misma malformación en la espina caudal (apartado 4.2.2.1, Figura 46). Respecto al sexo, las hembras representaron el 30 %.

4.2.3.3 Exposición conjunta generación F0

A lo largo del ensayo se registró la supervivencia de las madres y se recolectaron diariamente los neonatos. No hubo mortalidad a lo largo de todo el ensayo ni en el grupo control ni en las dafnias expuestas a las diferentes concentraciones. La supervivencia fue del 100 % al finalizar el ensayo (21 días).

La Tabla 17 el tamaño promedio de la puesta respecto al número de hembras. Al igual que para procloraz, para el establecimiento de las camadas estas se agruparon cada tres días consecutivos a partir de la primera puesta registrada en el grupo control ($f = 5$). Sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos en el experimento crónico individual de F0, el número de puestas en los grupos tratados sería inferior a 5, ya que este parámetro se encuentra alterado. Se optó por esta división para poder

realizar una comparación respecto al grupo control, pues la distinción entre puestas no fue posible al estar todos los individuos expuestos de manera conjunta. En el caso de las concentraciones de piriproxifen 6.12 y 14.02 $\mu\text{g/L}$, el valor $f1_1$ es 0.00, indicando que para estas concentraciones el tiempo a la primera puesta promedio se retrasó un mínimo de 3 días respecto al grupo control. En el caso de 3.14, 4.72, y 8.41 $\mu\text{g/L}$, este parámetro se retrasó como máximo 2 días, por lo que sí hubo registro para la $f1_1$.

Tabla 17.- Tamaño promedio de la camada en función del número de neonatos y supervivencia de las hembras expuestas a piriproxifen para cada una de las puestas.

Grupo	$f1_1$	$f1_2$	$f1_3$	$f1_4$	$f1_5$
Control	20.23	25.53	15.05	23.05	10.88
Concentración Piriproxifen $\mu\text{g/L}$					
3.14	0.13	1.40	1.95	2.35	2.18
4.72	0.13	0.93	2.18	1.70	1.68
6.12	0.00	0.53	1.28	1.28	1.08
8.41	0.15	0.93	2.03	1.68	1.05
14.02	0.00	0.30	1.60	1.43	0.78

En el gráfico que se muestra a continuación (Figura 55), se observa cómo el número de neonatos acumulado en todos los tratamientos es muy reducido en comparación con el grupo control que registró un valor final cercano a 3800 animales.

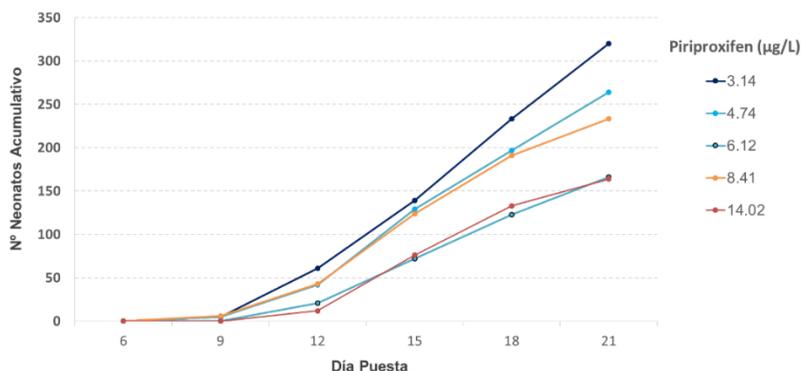


Figura 55.- Representación gráfica del número de neonatos acumulado para cada una de las concentraciones ensayadas de piriproxifen a lo largo del experimento.

Por otro lado, de forma cualitativa se observó un marcado cambio en el patrón de coloración de las dafnias que habían estado expuestas a piriproxifen, independientemente de la concentración. Mientras que los controles presentaron una coloración parda, las hembras tratadas adquirieron una tonalidad rosada. Se procedió a realizar la medición de 10 individuos, ya que se observó no solo que las dafnias tratadas con piriproxifen alcanzaban un tamaño inferior a las del grupo control (entre un 15 y un 20 % por debajo de las dafnias control), sino que también la proporción que representaba la espina caudal frente a la longitud total del individuo era inferior, lo que podría indicar no solo en el tamaño anomalías, sino también en el desarrollo de los individuos. La Figura 56 muestra fotografías de dafnias pertenecientes al ensayo conjunto de piriproxifen en la generación F0. Se observa la marcada diferencia tanto en la coloración, como en la longitud corporal y longitud de las espinas caudales de ambos individuos.

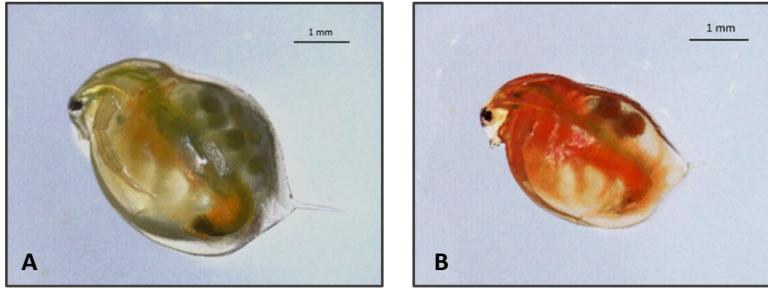


Figura 56.- Imagen **A**: hembra del grupo control al finalizar el experimento. Imagen **B**: hembra del grupo tratado con piriproxifen a una concentración de 14.02 $\mu\text{g/L}$ al finalizar el ensayo. Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico, aumentos 30 x.

En la Figura 57 se representan gráficamente los resultados obtenidos. La relación entre el tamaño de la cámara incubadora y el tamaño del individuo no se vio alterada en las dafnias expuestas a ninguna de las concentraciones ensayadas.

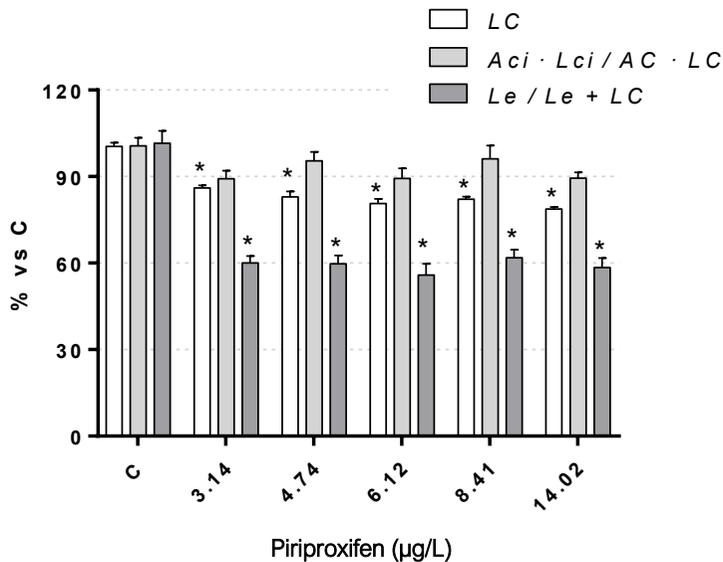


Figura 57.- Porcentaje de variación frente al control (C) y entre tratamientos, de la longitud corporal (LC), proporción cámara incubadora ($Aci \cdot Lci$) respecto al tamaño corporal ($AC \cdot LC$), y proporción espina caudal (Le) respecto a la longitud total ($Le + LC$) en *D. magna* en el ensayo F0 conjunto con piriproxifen. *Diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p < 0.05$).

Análisis morfológico de los neonatos

A lo largo del experimento todas las camadas fueron recolectadas y preservadas en etanol para su posterior análisis con el microscopio estereoscópico como se indicó en el apartado de Material y Métodos. Se contaron y analizaron en total casi 5000 neonatos, que se clasificaron en normales, si presentaban una morfología acorde a su estadio de desarrollo, o con malformaciones, si se observó alguna anomalía que pudiera comprometer su normal desarrollo. En la Tabla 18 se muestra la prevalencia total de malformaciones en cada uno de los tratamientos con piriproxifen y en el grupo control del experimento. La totalidad de los neonatos nacidos de madres expuestas a piriproxifen en el ensayo conjunto presentaron alguna malformación respecto a los individuos neonatos control. La malformación más frecuente fue la no completa extensión de la espina caudal (apartado 4.2.2.1).

Por otra parte, como queda reflejado en la Tabla 18, conforme aumentó la concentración del insecticida, también lo hizo el porcentaje de individuos que presentaron malformaciones.

Tabla 18.- Resultados obtenidos en el análisis de los neonatos recolectados durante el ensayo crónico de dafnias expuestas a diferentes tratamientos del insecticida piriproxifen. Se indica el número total de neonatos analizados por tratamiento, y el porcentaje de hembras, de machos, y de individuos malformados encontrados en cada grupo analizado. Entre paréntesis se indica el % de individuos excluidos del sexaje.

Grupo	Total individuos	Malformados (%)	Sexo	
			Hembras (%)	Machos (%)
Control	3789	0.37	100	0
3.14 µg/L	320	100 (18)	5.3	95
4.72 µg/L	264	100 (18)	4.2	97.5
6.12 µg/L	166	100 (22)	4.6	97.5
8.41 µg/L	233	100 (20)	4.3	100
14.02 µg/L	164	100 (28)	5.1	85

Mientras que en la concentración de 3.14 µg/L se descartó un 18 % de los neonatos debido a que no fue posible determinar el sexo debido al elevado nivel de malformaciones, en la concentración de 14.02 µg/L este porcentaje ascendió hasta un 28 %.

Entre las malformaciones observadas se encontraron las siguientes (Figura 58): individuos con malformaciones a nivel general (imagen B), neonatos sin ojos o subdesarrollados (imágenes C y D), individuos subdesarrollados (imágenes E derecha, F y G), espina caudal no extendida o deformada (imagen E izquierda), o defectos en el caparazón (imagen H).

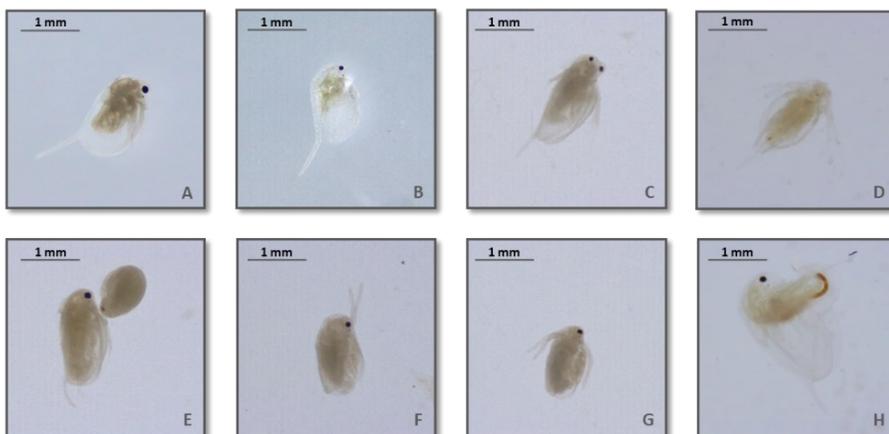


Figura 58.- Neonatos de *D. magna* (≤ 24 horas) de madres F0 expuestas de forma conjunta a piriproxifen. Imagen **A**: neonato control con desarrollo normal. Imágenes **B-H**: algunas malformaciones encontradas en los neonatos procedentes de madres expuestas a diferentes concentraciones de piriproxifen. Fotografías tomadas con aumento 55x.

Al igual que en los neonatos estudiados en los ensayos crónicos individuales de las generaciones F0 y F1, la malformación que mayor incidencia tuvo lugar fue la mostrada en el apartado 4.2.2.1, Figura 43, correspondiendo en promedio a un 80 % de los neonatos analizados (Tabla 18). Del porcentaje restante, un 16 % se compuso por individuos subdesarrollados. En el 4 % restante se englobaron el resto de malformaciones determinadas.

4.2.4 Parámetros bioquímicos

Los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros bioquímicos analizados en las dafnias expuestas a las diferentes concentraciones del insecticida piriproxifen se recogen en la Tabla 19.

El contenido en **proteínas totales** no se vio afectado por ninguna de las concentraciones del insecticida a la que fueron expuestos los animales del ensayo. Sin embargo, se observaron fluctuaciones en el contenido en **colesterol total** en las dafnias expuestas a las concentraciones inferiores y superior (Tabla 19, Figura 59), produciéndose una reducción promedio del 30 %. Las concentraciones intermedias (6.12 y 8.41 $\mu\text{g/L}$) aunque se mostraron también por debajo del valor control, no mostraron diferencias significativas probablemente debido al margen de las desviaciones. Por ello, el análisis estadístico confirmó la existencia de diferencias estadísticamente significativas solo para las dafnias expuestas a las concentraciones de 3.14, 4.74 y 14.02 $\mu\text{g/L}$ frente a los valores obtenidos en el grupo control.

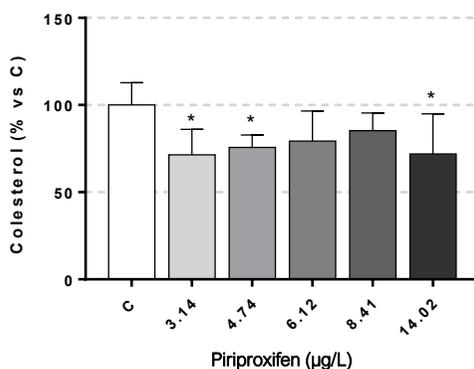


Figura 59.- Porcentaje de variación frente al control (C), del contenido en colesterol total en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del insecticida. *Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$).

A diferencia de lo ocurrido con el colesterol total, los valores de **triglicéridos** no se vieron alterados en las dafnias expuestas a las diferentes concentraciones del insecticida al compararlas frente al grupo control.

Con respecto a los carbohidratos analizados, ni la **glucosa total** ni el **lactato** medidos en las dafnias mostraron diferencias estadísticamente significativas frente al grupo control tras los 21 días de exposición al insecticida ($p > 0.05$). Sin embargo, en la actividad **LDH** sí se observó un aumento conforme lo hizo la concentración de exposición a piriproxifen. El análisis estadístico mostró que este aumento en comparación con el grupo control era estadísticamente significativo en las dafnias expuestas a la concentración más elevada, con un aumento de la actividad del 30 %, respecto al grupo control. En la Figura 60 se representan gráficamente los resultados obtenidos como % respecto al grupo control. En la Tabla 19 se muestran los valores obtenidos para LDH expresados en U/mL/ind.

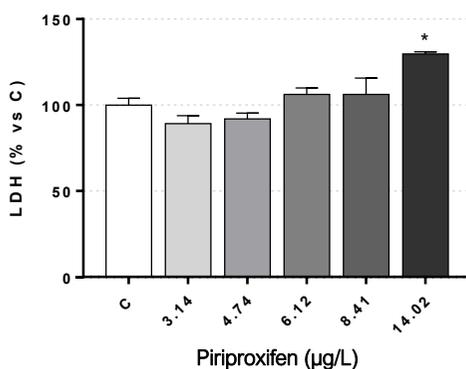


Figura 60.- Porcentaje de variación frente al control (C), de LDH en *D. magna* expuesta a diferentes concentraciones del insecticida. *Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$).

Tabla 19.- Valores medios y desviaciones típicas de los metabolitos bioquímicos estudiados en individuos de *D. magna* expuestos a diferentes concentraciones del insecticida piriproxifen durante 21 días.

Tratamiento	Contenido proteico (mg/mL/ind)	Colesterol (mg/mL/ind)	Triglicéridos (mg/dL/ind)	Glucosa (mg/dL/ind)	Lactato (mg/dL/ind)	LDH (U/mL/ind)
Control	2.82 ± 0.29	0.15 ± 0.02	0.43 ± 0.12	0.37 ± 0.06	0.05 ± 0.01	1.32 ± 0.13
3.14 µg/L	2.82 ± 0.16	0.11 ± 0.02*	0.41 ± 0.16	0.38 ± 0.04	0.04 ± 0.01	1.18 ± 0.15
4.74 µg/L	2.74 ± 0.11	0.12 ± 0.01*	0.33 ± 0.10	0.40 ± 0.03	0.04 ± 0.01	1.21 ± 0.11
6.12 µg/L	2.91 ± 0.17	0.12 ± 0.03	0.32 ± 0.13	0.36 ± 0.05	0.04 ± 0.01	1.40 ± 0.12
8.41 µg/L	3.02 ± 0.19	0.13 ± 0.02	0.36 ± 0.14	0.41 ± 0.08	0.05 ± 0.01	1.40 ± 0.31
14.02 µg/L	2.79 ± 0.12	0.11 ± 0.04*	0.36 ± 0.23	0.31 ± 0.03	0.05 ± 0.01	1.71 ± 0.02*

*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al grupo control.

4.2.5 Expresión génica

4.2.5.1 Proteínas de choque térmico

Los resultados obtenidos en el estudio de la expresión de los genes que codifican para las proteínas de choque térmico se muestran en la Figura 61. Mientras que la expresión de *hsp70* se mantuvo en línea con la del grupo control, para el gen *hsp90* se redujo su expresión, inhibiéndose en promedio un 50 % (*fold-change* de 0.5) frente al valor obtenido en el grupo exento de plaguicida. El análisis estadístico ANOVA puso de manifiesto que efectivamente esas diferencias eran estadísticamente significativas ($p < 0.05$). El test *post-hoc* Dunnett indicó que todos los grupos que habían sido tratados eran diferentes respecto al grupo control.

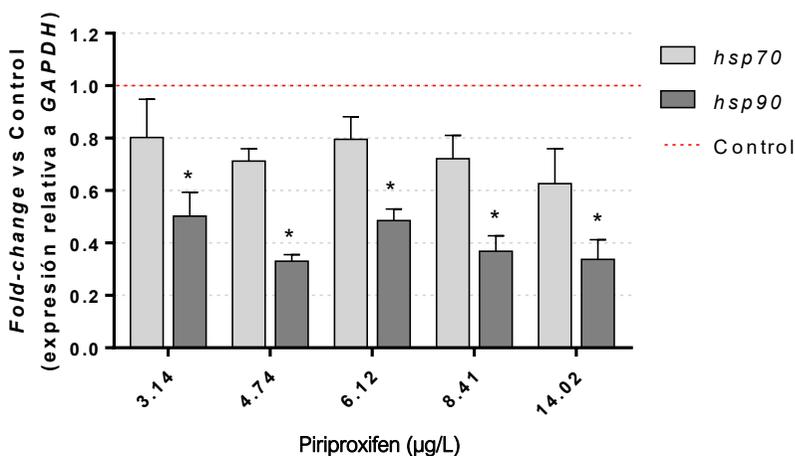


Figura 61.- Representación gráfica de la media y SEM de la expresión relativa de *hsp70* y *hsp90* respecto al gen de referencia *GAPDH* en dafnias expuestas a diferentes tratamientos del insecticida piriproxifen. *Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$).

4.2.5.2 Metabolismo de lípidos

Para evaluar si se producían alteraciones en la síntesis de lípidos en *D. magna*, se estudiaron las posibles alteraciones que podía sufrir el gen *fabd* al estar los individuos expuestos a concentraciones crecientes del insecticida piriproxifen. En la Figura 62 se muestran los resultados obtenidos para la expresión de este gen en cada uno de los tratamientos respecto al grupo control. Tras realizar el análisis de la varianza (ANOVA), y test de Dunnett para determinar diferencias respecto a los tratamientos frente al grupo control se evidenció que todos los grupos presentaron inhibida la expresión de este gen al compararlas con el grupo control. En promedio, la expresión de este gen se redujo en los grupos tratados un 40 % (*fold-change* de 0.6) en promedio.

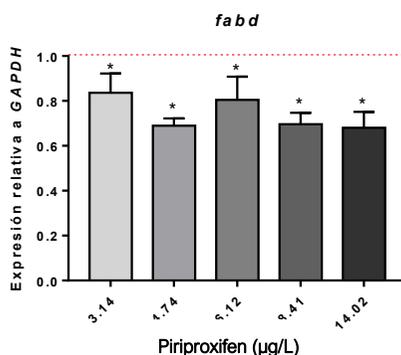


Figura 62.- Representación gráfica de la media y SEM de la expresión relativa de *fabd* respecto al gen de referencia *GAPDH* en dafnias expuestas a diferentes tratamientos del insecticida piriproxifen. *Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$). (---) representa la media del grupo control.

4.2.5.3 Vitelogeninas

Con el fin de evaluar posibles efectos en la reproducción se estudió la expresión de los genes *vtg1* y *vtg2*, involucrados en la síntesis de

proteínas del vitelo, y necesarias para su maduración. La Figura 63 muestra los resultados obtenidos para la expresión relativa de ambos genes respecto al gen de referencia *GAPDH* para el grupo control y los grupos tratados con el insecticida piriproxifen.

Se observa una clara disminución en la expresión de ambos genes, con *fold-change* por debajo de 0.2 (reducción en la expresión superior al 80 %) respecto a la del grupo control. El análisis ANOVA y test *post-hoc* Dunnett indicaron que entre todos los tratamientos y el grupo control dichas diferencias eran estadísticamente significativas.

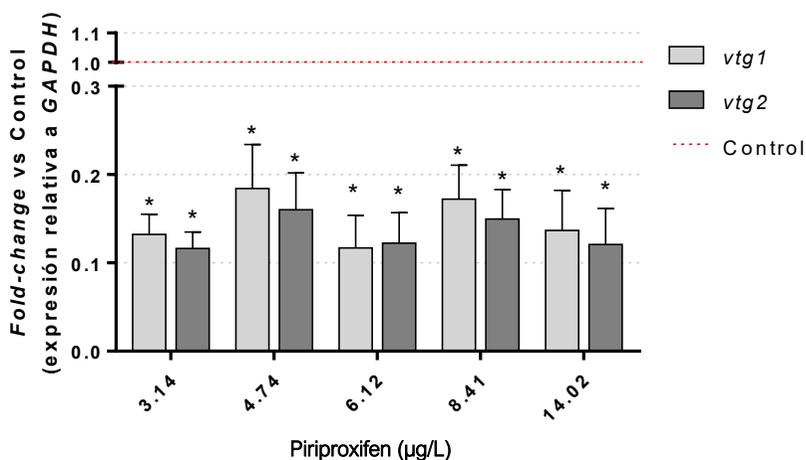


Figura 63.- Representación gráfica de la media y SEM de la expresión relativa de *vtg1* y *vtg2* respecto al gen de referencia *GAPDH* en dafnias expuestas a diferentes tratamientos del insecticida piriproxifen. *Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$).

4.2.5.4 Estrés oxidativo

Para evaluar posibles alteraciones en individuos de *D. magna* en rutas relacionadas con el estrés oxidativo producido por la presencia de insecticida, se seleccionaron los genes *gst* y *cat*, y se estudió la expresión

relativa de ambos respecto al gen de referencia *GAPDH*. En la Figura 64 se muestran los resultados obtenidos.

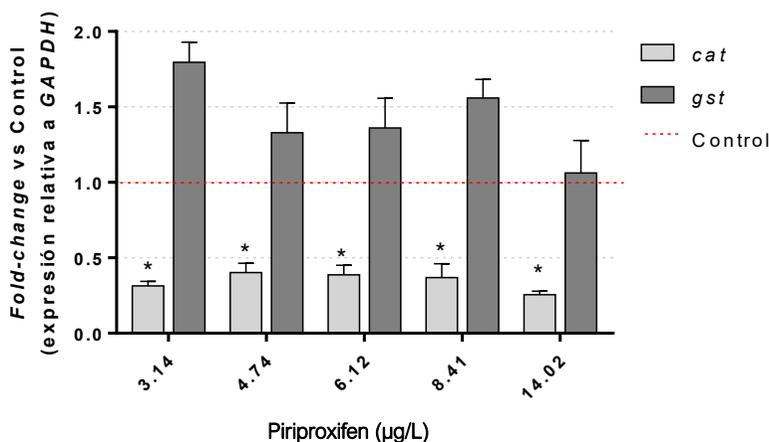


Figura 64. - Representación gráfica de la media y SEM de la expresión relativa de *gst* y *cat* respecto al gen de referencia *GAPDH* en dafnias expuestas a diferentes tratamientos del insecticida piriproxifen. *Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$).

Tras realizar el análisis estadístico ANOVA, este indicó que en el caso del gen *gst* la exposición a insecticida no modificó la expresión de este gen respecto a la del grupo control. Sin embargo, en el caso de *cat*, se produjo una inhibición de la expresión estadísticamente significativa ($p < 0.05$) Se determinó que todas las concentraciones ensayadas de piriproxifen indujeron un descenso en la expresión superior al 50 % (*fold change* por debajo de 0.5) en promedio.

4.2.5.5 Metalotioneinas

Para evaluar posibles alteraciones en rutas relacionadas con el metabolismo de los xenobióticos por la presencia de insecticida en *D. magna*, se seleccionaron los genes *mt-a*, *mt-b* y *mt-c*, y se estudió su expresión relativa respecto al gen de referencia *GAPDH*. En la Figura 65

se muestran los resultados obtenidos. A pesar de observarse una sobreexpresión en los genes *mt-a* y *mt-c*, ninguna de las concentraciones ensayadas del insecticida modificó la expresión de las metalotioneínas de forma estadísticamente significativa, tal y como corroboró el análisis estadístico ANOVA.

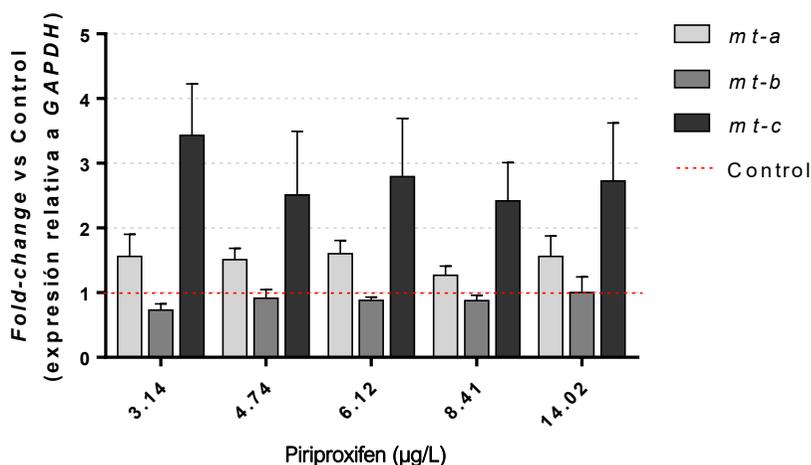


Figura 65.- Representación gráfica de la media y SEM de la expresión relativa de *mt-a*, *mt-b* y *mt-c* respecto al gen de referencia *GAPDH* en dafnias expuestas a diferentes tratamientos del insecticida piriproxifen. *Diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p < 0.05$).

4.2.5.6 Hemoglobina

Los genes que codifican para la síntesis de hemoglobina sí vieron modificada su expresión tras la exposición de las dafnias al insecticida piriproxifen (Figura 66).

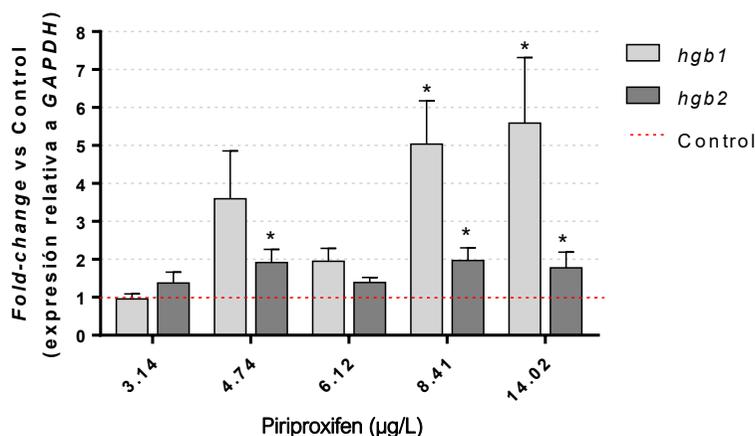


Figura 66.- Representación gráfica de la media y SEM de la expresión relativa de *hgb1* y *hgb2* respecto al gen de referencia *GAPDH* en dafnias expuestas a diferentes tratamientos del insecticida piriproxifen. * $p < 0.05$.

Tras realizar el análisis ANOVA y test de Dunnett *a posteriori*, se puso de manifiesto que las diferencias para la expresión de *hgb1*, solo eran estadísticamente significativas frente al grupo control ($p < 0.05$) en las dafnias expuestas a las dos concentraciones más altas, 8.41 y 14.02 µg/L, con un *fold-change* por encima de 5. Respecto de las diferencias en la expresión de *hgb2*, el análisis estadístico indicó se encontraban en las dafnias expuestas a las concentraciones 4.74, 8.41 y 14.02 µg/L al comparar la expresión respecto a la obtenida en el grupo control, con *fold change* en torno a 2.

4.2.6 Resumen resultados insecticida piriproxifen

A continuación, se muestra un cuadro resumen (Figura 67) de los resultados principales obtenidos en los diferentes ensayos realizados en *D. magna* con el fungicida procloraz a diferentes concentraciones.

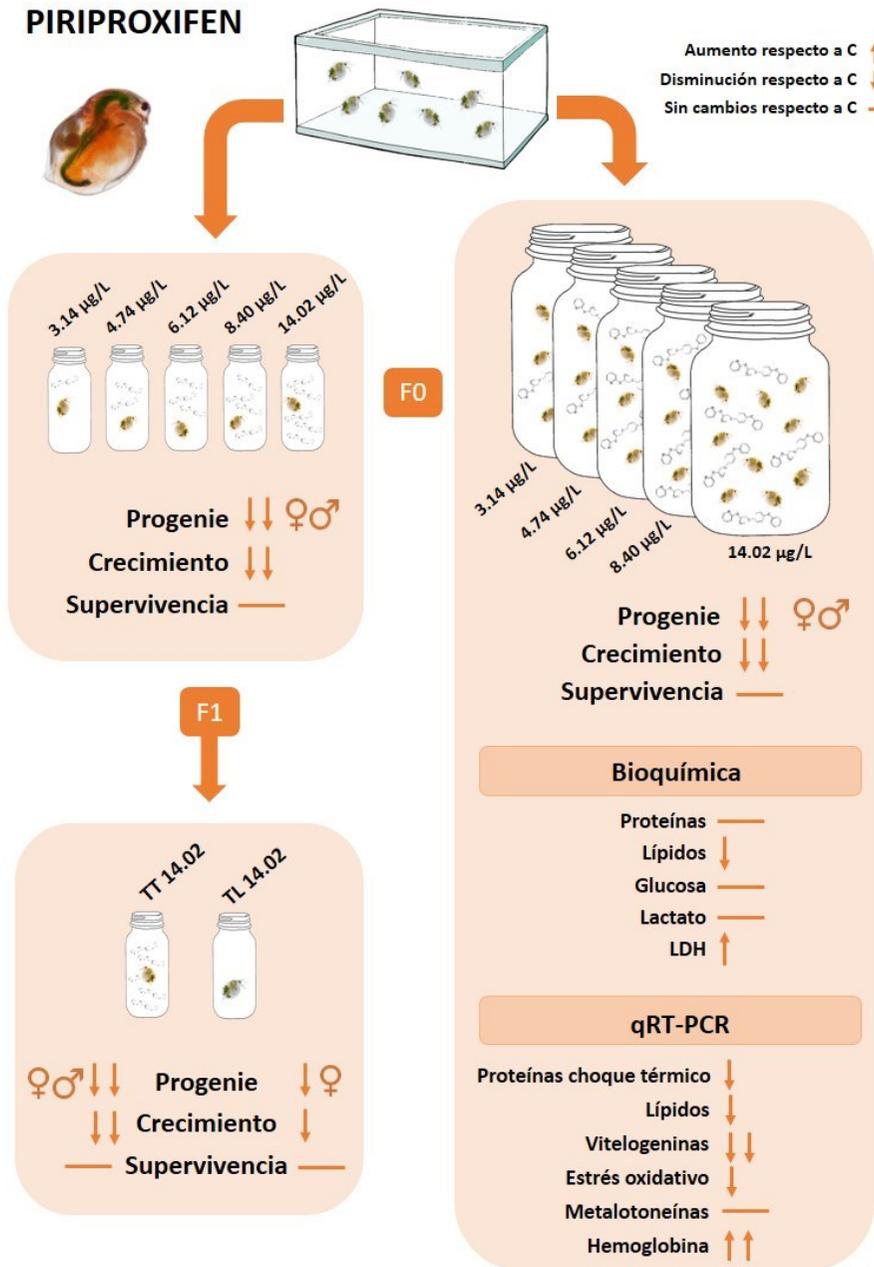


Figura 67.- Resumen de los resultados de los ensayos realizados en *D. magna* expuestas al insecticida piriproxifen.

5. Discusión

5 DISCUSIÓN

5.1 Estudio de la toxicidad aguda

Durante décadas, el crustáceo *Daphnia magna* se ha empleado extensamente como bioindicador de aguas contaminadas debido, entre otras características, a su alta sensibilidad. Los estudios relacionados con la especie son cada vez más amplios e interdisciplinarios, permitiendo analizar a diferentes niveles de organización biológicos (nivel de organismo, fisiológico, bioquímico y molecular) de qué forma el individuo interacciona con las diferentes sustancias contaminantes que pueden llegar a su hábitat.

En el capítulo 4 se expusieron los resultados obtenidos en los estudios de toxicidad aguda en *D. magna* para los plaguicidas seleccionados. Ambos resultaron ser más tóxicos a 48 que a 24 horas de exposición, ya que las CE_{50} disminuyeron conforme aumentó el tiempo de ensayo. En el caso del fungicida procloraz, las CE_{50} que se obtuvieron fueron 9.6 y 9.2 mg/L para 24 y 48 horas respectivamente, indicando que para alcanzar a 48 horas el mismo efecto que a 24, hubo que reducir la concentración de exposición un 5 %, evidenciando que existe solo un leve aumento de la toxicidad aguda a 48 horas. En el caso del insecticida piriproxifen, los resultados para la CE_{50} fueron 479.8 y 336.5 μ g/L para 24 y 48 horas respectivamente. En este caso la reducción de la concentración a 48 horas supuso un 30 % respecto a 24 horas para conseguir la inmovilización del 50 % de los neonatos expuestos,

reflejando que la toxicidad del insecticida aumentaba considerablemente al prolongar la exposición de los animales a las concentraciones ensayadas.

Piriproxifen no resultó únicamente ser más tóxico que procloraz a corto plazo, al potenciar su efecto conforme se aumentó el tiempo de exposición de los animales, sino que la concentración necesaria de insecticida para conseguir el mismo efecto a ambos tiempos de exposición fue 20 veces inferior respecto al fungicida.

Estudios previos de toxicidad aguda llevados a cabo por otros autores han puesto de manifiesto que ambos productos son más tóxicos para *D. magna* en relación con los resultados obtenidos en el presente estudio. Gottardi y Cedergreen (2019) obtuvieron una CE_{50} tras 48 horas de exposición al fungicida procloraz en *D. magna* de 4.8 mg/L.

Por su parte, autores como Abe *et al.*, (2015) obtuvieron para el insecticida piriproxifen una CE_{50} a 48 horas de 185 μ g/L.

En ambos casos la CE_{50} obtenida fue casi la mitad que la registrada en este estudio, siendo los medios utilizados en los ensayos mencionados para realizar las diferentes diluciones de los plaguicidas, M4 y M7 respectivamente, recomendados por la OECD 211. Esta diferencia en las toxicidades obtenidas podría ser reflejo de las diferentes composiciones del medio empleado, ya que está demostrado que ambos medios pueden reducir la toxicidad aparente producida por determinados compuestos, entre ellos metales como el cadmio, debido a que en su composición está presente el agente quelante EDTA (OECD, 1997). En este trabajo, se

utilizó agua declorada procedente de la red de agua potable municipal, cuya dureza total se ajustó empleando sales y/o agua destilada (misma agua que se emplea para el mantenimiento de la colonia). La OECD establece que la dureza del medio empleado debe ser superior a 140 mg/L de CaCO₃. Aunque ninguno de los trabajos referidos especificó la dureza final del medio empleado, podría ser que en el presente estudio la dureza fuera superior a la de los medios M4 o M7. Ello podría influir en la toxicidad de los plaguicidas al interferir las diferentes características del medio de cultivo.

En estudios previos, plaguicidas pertenecientes al grupo de los azoles como el tebuconazole o el triciclazole, fueron menos tóxicos que procloraz para *D. magna* a 48 horas, con CE₅₀ de 40.1 y 34 mg/L respectivamente (Sancho *et al.*, 2009; Rossaro y Cortesi, 2013).

Por otro lado, la elevada toxicidad de piriproxifen obtenida en el presente estudio concuerda con los resultados obtenidos por otros investigadores en otras especies acuáticas, aunque *D. magna* seguiría siendo el organismo más sensible frente a este plaguicida. Brown *et al.*, (1996), quienes estudiaron la toxicidad aguda del piriproxifen en adultos del decápodo marino *Leander tenuicornis*, y obtuvieron un valor de CL₅₀ a 96 horas de 98 µg/L. Haselman *et al.*, (2018), determinaron que en estadios larvarios tempranos del anfibio *Xenopus laevis* concentraciones superiores a 200 µg/L de piriproxifen causaban una elevada mortalidad.

Sin embargo, la baja toxicidad registrada para procloraz en contraste con otros plaguicidas, como los insecticidas, debe evaluarse más en

profundidad. Kretschmann *et al.*, (2015), observaron que los fungicidas procloraz y propiconazol se comportaban de una forma similar en cuanto a toxicidad aguda al exponer a individuos de *D. magna* a cada uno de ellos por separado, obteniendo CE_{50} a 0 y 8 horas dentro del mismo orden de magnitud tanto en grado de toxicidad como en aumento de la misma tras 8 horas de exposición (7.4/7.2 μM para el procloraz, y 6.2/5.8 μM respectivamente). Sin embargo, aunque el plaguicida α -cipermetrina presentó una CE_{50} menos tóxica, su efecto se potenció al aumentar el tiempo de exposición (4.2/2.2 μM). Al evaluar el efecto en combinación que presentaban cada uno de los fungicidas azoles (concentración constante a 1.5 μM) con el insecticida piretroide α -cipermetrina, observaron que la mezcla conformada por procloraz incrementaba significativamente la toxicidad de α -cipermetrina sobre *D. magna*, presentando un efecto sinérgico entre ambos plaguicidas (EC_{50} a 20 y 100 horas, 8 y 0.08 nM respectivamente), mientras que la mezcla con propiconazol tenía un efecto aditivo (EC_{50} a 20 y 100 horas, 9 y 5 nM respectivamente).

En vista de los valores obtenidos de CE_{50} para los plaguicidas estudiados de forma aislada, el insecticida piriproxifen es mucho más tóxico para *D. magna* que el fungicida procloraz, resultados esperables tanto según la bibliografía como la finalidad descrita para cada uno de ellos, pues cabe esperar que un insecticida afecte a otros organismos invertebrados aun no siendo la especie diana, mientras que este efecto no debería derivarse de la exposición a un fungicida. Sin embargo, aunque de forma individual procloraz no tenga una elevada toxicidad en la

dafnia, como se observa en los resultados de este trabajo, de forma conjunta con otros compuestos presentes en el medio podría provocar un efecto sinérgico, resultando en una mayor toxicidad que la causada de forma aislada por cada uno de los tóxicos. Debería pues prestarse especial atención no solo a la presencia de este compuesto de forma individual, sino a la potenciación de los efectos tóxicos que podría estar induciendo derivado de la coexposición con otros contaminantes.

5.2 Efecto sobre el comportamiento alimenticio

En el apartado de resultados se mostró cómo los individuos que se expusieron al fungicida procloraz y al insecticida piriproxifen a diferentes concentraciones, no mostraron alteraciones en los parámetros de ingesta o filtración del alga *Nannochloris oculata*, cuando fueron comparados respecto al grupo control. Este ensayo se llevó a cabo con individuos neonatos, y su duración fue de 5 horas (tal y como se describió en Material y Métodos).

Estudios previos han mostrado cómo el efecto sobre el comportamiento filtrador en las primeras horas de vida se vio claramente comprometido en dafnias expuestas a otros plaguicidas. Fernández-Casalderrey *et al.*, (1994) observaron cómo los insecticidas endosulfán y diazinon, provocaban un descenso en ambos parámetros al exponer a individuos de *D. magna* a diferentes concentraciones de estos plaguicidas. También ensayos llevados a cabo con el insecticida tebuconazole pusieron de manifiesto esta disminución en el comportamiento filtrador tras solo 5 horas de exposición a

concentraciones crecientes del tóxico (Sancho *et al.*, 2009). Sin embargo, la alteración de estos parámetros puede venir determinada por la propia acción del compuesto, ya que el éxito en la alimentación de los individuos filtradores viene dado por la capacidad del individuo para movilizar los apéndices y de esta forma, al generar corriente, poder filtrar el alimento que se encuentre en el medio (Day y Kaushik, 1987). Si el tóxico altera el sistema nervioso y reduce la coordinación, o provoca una parálisis total o parcial, las tasas de ingesta y filtración se verán reducidas. Incluso determinados compuestos como los insecticidas permetrina o fenvalerato pueden provocar la adhesión en los apéndices de partículas de alimento dificultando el movimiento de los mismos (Christensen *et al.*, 2005; Reynaldi *et al.*, 2006).

La alimentación en la dafnia es un comportamiento complejo, pues está regulada por la interacción de mecanismos fisiológicos, abarcando tanto la coordinación del funcionamiento intestinal con el aparato filtrador (Hartman y Kunkel, 1991). Por tanto, el envenenamiento intestinal o la alteración de la capacidad de filtrado pueden afectar a las tasas de filtración e ingestión. Se sabe que bajas concentraciones de metales como el cadmio o el cobre perjudican la alimentación en caso de intoxicación intestinal en la dafnia, muy probablemente al causar estrés oxidativo en los tejidos intestinales y las enzimas digestivas (Barata *et al.*, 2005).

Autores como De Castro-Catalá *et al.*, (2017) estudiaron los efectos producidos por el fungicida procloraz en la alimentación de *Gammarus pulex* sometidos durante 14 días a concentraciones inferiores a las

ensayadas en nuestro estudio. Tras el periodo de exposición determinaron que 6 µg/L de procloraz inducía un descenso de más del 70 % respecto al grupo que no había estado expuesto al fungicida.

Sin embargo, ninguno de estos efectos se vio reflejado en el presente estudio en el que se evaluaron estos parámetros en neonatos expuestos durante 5 horas a las concentraciones ensayadas de cada uno de los plaguicidas, pues no hubo diferencias estadísticamente significativas al contrastar los resultados con los obtenidos en el grupo control. Otros autores (Araujo *et al.*, 2019), estudiaron el comportamiento filtrador en *D. magna* ampliando el tiempo de estudio a 24 horas. Observaron como tanto el plomo como el fungicida mancoceb reducían significativamente tanto la tasa de ingestión como de filtración al compararla frente al grupo control tras el tiempo de exposición. En este caso, además, optaron por incluir un periodo de recuperación de los individuos trasvasándolos posteriormente a medio exento de tóxico para evaluar la tasa de recuperación durante un periodo post-exposición de 4 horas (todos los individuos excepto la concentración más alta testada de plomo alcanzaron tasas iguales a las del grupo control). Li *et al.*, (2020), por otro lado, optaron por el uso de individuos de 7 días de edad en lugar de neonatos, y observaron los efectos que el antibiótico azitromicin tenía sobre la tasa de ingestión de *D. magna* durante 24, 48, 72 y 96 horas. Aunque ya obtuvieron una clara disminución a las 24 horas, ésta se vio agravada tras las 96 horas de exposición.

De forma cualitativa en el estudio con piriproxifen, conforme fueron pasando los días del ensayo crónico (y las dafnias tratadas presentaban

un tamaño inferior a las del grupo control), se observó con el cambio diario de medio y recipiente que mientras los frascos del grupo control presentaban el fondo prácticamente transparente, los que contenían las dafnias tratadas con piriproxifen presentaban una tonalidad verdosa, indicativo del alga precipitada que no había sido filtrada e ingerida por los organismos (efecto no observado en las expuestas a procloraz). Este fenómeno podría estar asociado a una reducción en la ingesta, probablemente debido a su tamaño inferior y por tanto a la reducción en la cantidad de alga filtrada. Alteraciones de estos parámetros podrían solo ser reflejo por tanto de una exposición más prolongada que la ensayada en el presente estudio, o ser necesario el empleo de individuos juveniles en lugar de neonatos.

5.3 Estudio de la toxicidad crónica

La finalidad perseguida con el ensayo crónico de toxicidad siguiendo las recomendaciones de la OECD, fue evaluar posibles alteraciones provocadas por la exposición crónica a concentraciones subletales de los plaguicidas objeto de estudio. Así pues, se realizaron registros de los parámetros reproductivos seleccionados para determinar si los compuestos ensayados causaban alteraciones al comparar los resultados obtenidos frente a los individuos control. Se realizó el seguimiento del tamaño de la camada, del número de camadas totales, del tiempo transcurrido hasta la primera puesta, del número de neonatos por hembra, y de la longitud corporal de los individuos al finalizar el ensayo sobre un primer grupo de animales obtenidos de la colonia, generación F0, durante 21 días. También se registraron datos adicionales como la longitud de la

espina caudal, anchura del individuo, largo y anchura de la cámara incubadora, o el análisis morfológico de las camadas. De forma paralela, se evaluaron los mismos parámetros que los descritos para la generación F0, en individuos (generación F1) procedentes del ensayo crónico individual con F0 de los grupos control y la concentración testada más alta de cada plaguicida, 380 µg/L en el caso de procloraz, y 14.02 µg/L en el del piriproxifen, con la finalidad de estudiar la evolución de la generación F1, al estar o no sometidos nuevamente a la concentración de plaguicida de origen. Por otra parte, para analizar posibles alteraciones a nivel bioquímico y genético se expuso de forma conjunta a un grupo homogéneo de individuos (F0). Durante la fase de exposición se registraron todos los parámetros reproductivos y de supervivencia que fue posible obtener de forma conjunta. Se obtuvo información en términos de supervivencia, desarrollo y reproducción de tres formas diferentes: exposición individual de la generación F0, exposición individual de la generación F1, y exposición conjunta de la generación F0.

En el caso del **fungicida procloraz**, en el apartado de resultados, se mostró cómo en el ensayo de exposición individual de la generación F0 en líneas generales ni los parámetros reproductivos ni la supervivencia de los animales se vieron alterados de forma notable por la exposición al plaguicida. Ciñéndonos estrictamente a lo observado en el estudio, aunque al finalizar el ensayo la longitud corporal alcanzada por las dafnias tratados fue inferior a los del grupo control, esta diferencia probablemente no sea relevante en términos biológicos, ya que ninguno

de los demás parámetros reproductivos se vio afectado a las concentraciones ensayadas.

Sin embargo, parece que existió transmisión vertical madre-hija ya que en los individuos de la generación F1 procedentes de la tercera camada de los grupos control y procloraz 380 µg/L, se observó que algunos de los parámetros reproductivos comenzaron a sufrir alteraciones en los grupos tratados al compararlos con el grupo control. El hecho más relevante fue que aquellos individuos que procedían de madres expuestas a dicha concentración, y que se mantuvieron en las mismas condiciones de forma individual (TT 380), sufrieron un incremento del 17 % en el tamaño de la camada, mientras que en el grupo procedente de madres expuestas pero transferidas a medio exento de plaguicida (TL 380), se produjo un descenso del 15 % en este parámetro.

Al contrario que en los ensayos individuales, en el ensayo conjunto se observó un aumento en la mortalidad conforme aumentó la concentración de tóxico. Este fenómeno se asoció en primera instancia a la diferencia en la manipulación de los individuos: mientras que en los dos primeros ensayos los individuos fueron trasvasados de un recipiente a otro empleando una pipeta Pasteur, en este ensayo los medios se pasaron por un filtro. Se trata de un proceso habitual, y que como demostró el grupo control al tener una tasa de mortalidad del 0 %, en condiciones normales este estrés mecánico no debería afectar a la supervivencia de los individuos. Sin embargo, conforme se aumentó la concentración de procloraz, parece ser que las dafnias se volvieron más sensibles reflejándose en un aumento de la mortalidad. Conforme la

supervivencia se vio comprometida, el número de neonatos por hembra se incrementó, por lo que al finalizar el ensayo, aunque en las concentraciones ensayadas más altas llegó a producirse más de un 50 % de mortalidad, la supervivencia de la población no se vio afectada, pues el número total de neonatos llegó a alcanzar prácticamente valores equivalentes a los que se obtuvo en el grupo control.

También se observó que los individuos expuestos al fungicida alcanzaron longitudes superiores a los del grupo no expuesto, aunque solo supuso un 5 % de aumento respecto al grupo control. Sin embargo, al evaluar la relación entre el tamaño de la cámara incubadora y el tamaño total de la dafnia, se observó un aumento más acentuado, no habiéndose hallado esta diferencia en las hembras del ensayo individual F0. Se optó por realizar este estudio ya que, aun no habiéndose encontrado referencias en la bibliografía, pues únicamente está estandarizada la medición de la longitud del individuo sin contemplar la espina caudal, se observó de forma cualitativa que las hembras tratadas presentaban un aspecto más esférico en contraste con las hembras control, por lo que se decidió intentar cuantificar esta diferencia. En primera instancia, al no encontrar diferencias notables en la medición de la longitud, se procedió a comparar la anchura de los individuos, pero tampoco se hallaron cambios significativos. Solo al relacionar el tamaño de la cámara incubadora respecto al tamaño total del individuo se vieron alteraciones significativas, pues ésta abarcaba un porcentaje mayor frente al tamaño del individuo en las hembras tratadas respecto a las del grupo control. Y también se observó que la espina caudal en relación al

tamaño individual aumentó hasta duplicar prácticamente su tamaño respecto a la de las hembras control. Se ha asociado de manera directa las alteraciones en la morfología de *D. magna* (aumento de la longitud individual, anchura individual, y longitud de la espina caudal) con la presencia de depredadores. Autores como Rabus y Laforsch (2011) relacionaron el aumento del tamaño de la espina caudal en hembras de *D. magna* y en sus neonatos con la presencia del crustáceo branquiópodo *Triops cancriformis* (predador de dafnia). De modo que las kairomonas liberadas por el depredador al medio las reciben las hembras y son capaces de reaccionar y actuar sobre la descendencia. Estos autores indican que este proceso en la especie *D. magna* ayudaría a los individuos frente a este depredador por su mayor envergadura, esta mayor envergadura también se observó en las hembras primíparas expuestas a la presencia del depredador y no solo en su descendiente. No se ha encontrado bibliografía al respecto, pero la presencia de procloraz en el medio ha conllevado un aumento de tamaño en las dafnias y la espina caudal ha llegado a ser de hasta el doble en las madres expuestas a las concentraciones más elevadas de procloraz.

La tonalidad de los individuos fue otro parámetro evaluado de forma cualitativa mediante el registro fotográfico de los dáfnidos al finalizar el ensayo. Se observó en los tres supuestos, una marcada diferencia en el patrón de coloración de las madres expuestas a procloraz, que adquirieron un tono anaranjado, siendo esta variación mucho más evidente en los embriones ubicados en la cámara incubadora. Tal y como apuntaron Enserink *et al.*, (1990), la exposición a diferentes tóxicos

podría contribuir a una modificación en la dotación de lípidos por parte de la madre a los embriones gestados con el fin de garantizar su supervivencia en condiciones adversas. Los autores encontraron que en los embriones procedentes de madres expuestas a cadmio, aparecían pequeñas gotas de lípidos de color naranja. Podría ser una posible explicación al fenómeno observado en este estudio, pues los embriones adquirieron una coloración anaranjada conforme se aumentó la concentración de exposición a procloraz. Otra posible explicación podría estar en línea con la composición propia del procloraz ya que contiene tres moléculas de cloro en su estructura, lo que podría estar provocando un desequilibrio osmótico induciendo ese cambio tan evidente en la coloración de los individuos. Como se describió en el apartado 1.3.2, la coloración de la dafnia puede verse alterada tanto por modificaciones en la concentración de oxígeno presente en el medio como en la salinidad, se han descrito por varios autores como variaciones hacia anaranjados (Alonso, 1996), aunque en contrapartida estos cambios de coloración, ligados sobre todo a modificaciones en la concentración de O₂ del medio, se han descrito como variaciones hacia tonos rosados o rojizos (Fox *et al.*, 1951; Pirow *et al.*, 2001). Rider *et al.*, (2005) demostraron la asociación entre el aumento de los niveles de hemoglobina y el cambio en la coloración de *D. magna*, derivado de la exposición a varios compuestos análogos de la hormona juvenil como el metil farnesoato o el piriproxifen. Contrariamente a los resultados del presente estudio con el fungicida procloraz, estuvo asociado además con la presencia de machos entre las camadas de las madres expuestas.

Coakley *et al.*, (2018), estudiaron procesos adaptativos en individuos de la especie *D. magna*, y observaron cómo tanto el número total de neonatos, como el tamaño de los descendientes, y su capacidad reproductiva, variaba en función de si las condiciones ambientales eran más o menos óptimas para la supervivencia de la especie. Aunque existe cierta controversia respecto a las diferentes estrategias empleadas por la dafnia, ya que la aparición de puestas más numerosas y de peor calidad, o más pequeñas pero con individuos más resistentes, parece no seguir una pauta común clara (Tessier *et al.*, 1983; Enserink *et al.*, (1990). Autores como Wilson *et al.*, (2005) pusieron de manifiesto que las condiciones ambientales o fenotípicas de una madre podían condicionar de forma significativa multitud de aspectos de su descendencia, no solo en el caso de los vertebrados como mamíferos (Glezen, 2003), peces (McGhee *et al.*, 2012), o aves (Boulinier y Staszewski, 2008), sino también en invertebrados (Stjernman y Little, 2011), e incluso en plantas (Vivas *et al.*, 2015). Varios estudios teóricos han demostrado el gran potencial que pueden tener los efectos maternos para alterar la dinámica poblacional (Ginzburgh, 1998), la estructura genética de la población (Wolf *et al.*, 1998), o incluso en última instancia, el potencial evolutivo de la misma (Kuijper y Hoyle, 2015).

Kinbborg *et al.*, (2007), determinaron el efecto que tenía procloraz sobre el pez *Danio rerio*. Determinaron que la exposición de esta especie al fungicida inducía un aumento en la tasa de machos y en la aparición de individuos intersex en la población, actuando como androgénico. Haselman *et al.*, (2018) demostraron que en anfibios el procloraz tenía

un potente efecto antiandrogénico: al exponer a individuos pertenecientes a la especie *Xenopus laevis* a diferentes concentraciones de este fungicida, encontraron alteraciones en ambos sexos. Así, mientras que en los machos la reabsorción del conducto de Müller se inhibió, en las hembras se desarrolló prematuramente dando lugar a los oviductos (en el mismo periodo de tiempo, mientras que solo el 56% de las hembras control habían llegado a esta fase, todas las expuestas a procloraz ya la habían alcanzado).

Entre el grupo de individuos de *D. magna* que se expusieron a procloraz no se encontraron machos, y tampoco se hallaron en la descendencia. Sin embargo, el aumento en el tamaño de las puestas en el estudio conjunto de la generación F0, podría estar asociado, de forma conjunta o aislada, tanto a un mecanismo de supervivencia como estrategias de la r, como a un posible efecto antiandrogénico producido por el compuesto y potenciado por el tipo de exposición, ya que en el caso del ensayo crónico individual se observó solo un incremento demorado en la generación filial (F1), mientras que en el ensayo conjunto, este cambio se produjo desde la exposición de los parentales (F0).

Los resultados expuestos concuerdan con los obtenidos por Poulsen *et al.*, (2021). En sus estudios, varias generaciones de *D. magna* fueron tratadas con procloraz de forma individual, a una concentración de 100 µg/L. Observaron que la toxicidad producida por el compuesto no se reflejaba de forma directa en la primera generación expuesta, sino que el efecto tuvo lugar en la generación F2. Encontraron que en las

generaciones F0 y F1, los parámetros reproductivos no sufrían alteraciones respecto a los obtenidos en el grupo control, aunque registraron un tamaño inferior en la longitud de los neonatos procedentes de madres expuestas a esta concentración en F0, fenómeno que dejaron de observar en la F1 y asociaron a un proceso adaptativo de los individuos parentales a la presencia del tóxico. En la generación F2 el aumento de puestas fue estadísticamente significativo en el grupo tratado con procloraz respecto a los valores obtenidos para el grupo control. En nuestro caso, la exposición multigeneracional solo llega hasta la F1 a una concentración 3 veces superior a la testada en este estudio, observándose un aumento en el tamaño de las camadas de las hijas expuestas (F1) respecto al grupo control. Por otra parte, en el ensayo de exposición conjunta, esta marcada diferencia en cuanto al tamaño de las camadas se observó desde la generación F0.

Otros autores como Silva *et al.*, (2017) también han referido los mismos efectos tras exponer a dafnia a diferentes concentraciones del fungicida carbendazima, obteniendo un aumento en el número de neonatos en los animales expuestos. Asociaron estos cambios a un mecanismo compensatorio tratándose de estrategias de la r, ya que bajo condiciones desfavorables las hembras de la especie pueden producir una mayor descendencia conformada por individuos de menor tamaño. Hammers-Wirtz y Ratte (2000), realizaron una comparación en *D. magna* expuesta al dispersante Dispersogen A (dispersante empleado principalmente en pinturas y tintes), de manera individual y en ensayo conjunto. En ambos casos encontraron que el compuesto a una

concentración de 0.001 mg/L aumentaba el tamaño de las camadas de las madres frente al grupo control, aunque a su vez observaron que las camadas producidas, aunque con mayor número de descendientes, presentaban una calidad inferior: menor tamaño, menor peso seco, y mayor mortalidad, concluyendo que el reparto de biomasa en los neonatos respondía a un proceso adaptativo de las dafnias debido al cambio en los parámetros ambientales para poder mantener a la población bajo esas condiciones. Los autores resaltaron que para determinar la supervivencia de la especie no basta únicamente con hacer recuento de la descendencia y evaluar si los neonatos están vivos o no, sino que habría que tener en cuenta también la viabilidad de la misma. Otros autores como Seyoum y Pradhan (2019), también observaron un incremento del 150 % en el número de neonatos tras exponer a grupos de 10 hembras de forma conjunta al plastificante etilhexil ftalato 1 μ M.

Sin embargo, bien la ausencia de efecto en el caso del estudio individual de la generación F0, como el aumento en el tamaño de las camadas observado en el ensayo conjunto de la generación F0 del presente estudio, son contradictorios con los resultados obtenidos por Hassold y Backhaus (2009), quienes determinaron que la concentración de 0.76 μ mol/L (280 μ g/L) de procloraz reducía en un 50 % la fecundidad de las dafnias, junto a un retraso en el tiempo a la primera puesta.

Tras el estudio morfológico de la progenie de la generación F0 del ensayo individual, todos los individuos que registraron malformaciones visibles, presentaron el mismo tipo de anomalía (morfología de

caparazón). Esta clase de malformación ha sido citada previamente por Wang *et al.*, 2011: Estudiaron el efecto de 5 compuestos reguladores del crecimiento en plantas en embriones de *D. magna*. El paclobutrazol, perteneciente al grupo de los azoles, no resultó ser el más tóxico, pero sí el que mayor índice registró de malformaciones en embriones a menor concentración. Aunque con diferente finalidad, ambos azoles parecen inducir el mismo tipo de malformación en neonatos de esta especie.

Respecto a la proporción de sexos en el presente trabajo, en ningún caso se encontraron individuos macho, por lo que, junto al aumento del tamaño de las camadas por parte de las madres, estaría en línea con los resultados obtenidos por Haselman *et al.*, (2018), al observar en anfibios un efecto antiandrogénico tanto en machos como en hembras. También explicaría el fenómeno observado en el ensayo en la generación F1, ya que el grupo procedente de madres expuestas a procloraz y continuó con la misma concentración de exposición (TT 380) aumentó el número de neonatos por camada respecto al grupo control, fenómeno observado en el ensayo de exposición conjunta. Mientras que en el grupo de individuos procedentes de madres expuestas a los que se les retiró el tóxico (TL 380) este parámetro se redujo, lo que podría deberse a un efecto provocado por la retirada del plaguicida. Los resultados extraídos de las diferentes generaciones y formas de exposición estarían en línea con los obtenidos por Poulsen *et al.*, (2021), demostrando que los efectos de la exposición al procloraz en *D. magna* pueden tener lugar en las generaciones sucesivas a la expuesta, y que podría haber un intervalo de tiempo entre la exposición y la aparición de los efectos. Además, parece que la forma

de exposición al fungicida (individual o conjunta) puede modificar la velocidad de respuesta frente al tóxico en esta especie.

El **insecticida piriproxifen** resultó ser muy tóxico en las tres modalidades de ensayo, induciendo una gran reducción tanto en los parámetros reproductivos de los animales expuestos, como en la longitud individual alcanzada, a pesar de que en ningún caso la supervivencia de las dafnias se vio comprometida pues todas alcanzaron los 21 días de edad.

El número total de neonatos por hembra se redujo de idéntica forma en los tres supuestos, llegando a alcanzar un descenso en torno al 95 % en todos los casos para la concentración más alta de exposición (14.02 $\mu\text{g/L}$) respecto a las hembras control. El tiempo a la primera puesta, indicativo de la edad a la que se alcanza la madurez reproductiva, también se vio demorado de manera similar en las dafnias expuestas al insecticida de los tres ensayos, reflejando un retraso entre los 12 y 14 días para la concentración más alta ensayada. El parámetro individual longitud se redujo, de manera dosis-dependiente, un 20 % en promedio respecto al tamaño alcanzado por los individuos control. La proporción de la espina caudal respecto al tamaño corporal también disminuyó en todos los casos llegando a ser la proporción casi un 50 % inferior en los individuos tratados frente a las dafnias control. Respecto al número medio de camadas y neonatos por camada, no se pudieron comparar los tres ensayos, ya que no fue posible calcular estos parámetros en el ensayo conjunto. Sin embargo, los resultados de las hembras entre la generación F0 y la F1 también resultaron prácticamente idénticos. Así pues,

independientemente de la forma de exposición, o de la generación expuesta (al menos hasta la F1), el insecticida produjo toxicidades prácticamente idénticas. Varios autores (Naddy *et al.*, 2000; Zalizniak y Nugegoda, 2006) observaron que insecticidas como el clorpirifós, inducían una reducción en los parámetros reproductivos cuando las dafnias eran expuestas a concentraciones entre 0.005 y 0.5 µg/L, sin embargo, Palma *et al.*, (2009), testaron el mismo compuesto a las concentraciones de 0.01 y 0.03 µg/L y no observaron una reducción en dichos parámetros, aunque sí registraron un incremento en las malformaciones de los neonatos.

La toxicidad observada producida por piriproxifen concuerda con los resultados obtenidos en el grupo TL del ensayo individual sobre la generación F1: Todos los parámetros mostraron una rápida recuperación, llegando algunos incluso a valores equivalentes a los del grupo control, al encontrarse los individuos en medio libre del insecticida, y poniendo por tanto de manifiesto que la acción del insecticida ejerce su principal efecto cuando está en contacto directo con el organismo. Otros autores también han estudiado la capacidad de recuperación de sucesivas generaciones de *D. magna* al exponer a una primera generación ante un agente tóxico. Martins y Guilhermino (2018), observaron como en dafnias expuestas a microplásticos, varios de los parámetros en la generación sucesiva se mantenían en niveles idénticos a los del grupo control (supervivencia, nº de camadas, tiempo a la primera puesta), una vez el tóxico era eliminado del medio, mientras que otros (nº de neonatos por hembra totales, o tamaño de la camada), necesitaban varias

generaciones para recuperarse por completo. Por otro lado, en estudios realizados por Völker *et al.*, (2013), observaron como tres especies diferentes de dafnia respondían de forma distinta ante nanopartículas de plata. Mientras que la segunda generación de *Daphnia galatea* y *Daphnia pulex* ya mostraba una recuperación completa, *Daphnia magna* necesitaba más de 4 generaciones consecutivas para alcanzar los valores del grupo control, evidenciando que esta especie del género dafnia era la más sensible de las tres empleadas.

Al margen de los efectos tóxicos producidos por el insecticida sobre los parámetros individuales de reproducción, desarrollo y supervivencia, es interesante resaltar el hecho de que en el ensayo individual de la generación F1, donde se emplearon neonatos pertenecientes a la segunda camada del grupo control y de la concentración más alta, 14.02 µg/L, entre los animales experimentales hubo machos, con una representación del 75 %. Es por ello que, aunque la tasa intrínseca de crecimiento natural, como parámetro poblacional, alcanzó prácticamente los valores del grupo control para TL, el empleo de este índice solo podría resultar representativo de la evolución de la población siempre y cuando esta se componga únicamente por hembras. En nuestro caso, el elevado porcentaje de machos no se ve reflejado ni afecta a su cálculo (pues solo se contemplaron las hembras), por lo que distorsiona la realidad, pues a pesar de que las hembras consiguiesen alcanzar valores muy similares a los del grupo control, la capacidad de reproducción de la población no es la misma, ya que solo representaron un 25 % de éste en el grupo experimental.

En el presente estudio, la prevalencia de machos en algunas de las camadas analizadas fue del 100%, pero en otras sí aparecieron hembras. En el posterior ensayo de recuperación que se realizó con individuos de la generación F1, procedentes de la 2ª camada de la generación F0, se observó la presencia de 3 y 4 hembras respectivamente en los grupos TL y TT del total de 15 individuos. Al comparar el sexo de los neonatos de ambos grupos, las de las hembras TL 14.02 fueron íntegramente hembras, mientras que en las TT 14.02 seguía habiendo presencia también de machos. Los resultados presentados en esta tesis doctoral se encuentran en línea con los observados por Kato *et al.*, 2010, quienes demostraron que el periodo crítico para la acción de la hormona juvenil en el desarrollo de los oocitos respecto a la inducción de machos en la especie *D. magna* se establece entre 7 y 8 horas antes de la ovulación en el ovario. En nuestro caso, las hembras expuestas en medio exento de plaguicida, pero procedentes de madres tratadas a la concentración más alta de piriproxifen, no tuvieron entre los individuos de sus camadas ningún macho. Podría decirse que el efecto que produce el insecticida no tiene acción multigeneracional sobre la determinación del sexo de la descendencia, sino que la acción del plaguicida solo tiene lugar a través de la exposición directa.

Nuestros resultados también se encuentran en línea con estudios anteriores realizados por Ginjupalli *et al.*, (2013). La exposición en este caso no se inició como en el nuestro desde la edad ≤ 24 horas de las dafnias, si no en individuos adultos de 10, 17 o 23 días de edad, lo que podría justificar que tampoco registrasen una incidencia tan manifiesta

en la reducción de las puestas, ya que, aun siendo todos los descendientes machos, el número total de neonatos no fue estadísticamente diferente respecto al grupo control. Por otro lado, en otro estudio evaluaron la prevalencia de machos en las camadas de *D. magna* sometidas a diferentes concentraciones de piriproxifen (25-400 ng/L), con diferentes tiempos de exposición, aunque tampoco emplearon neonatos, sino juveniles de 3 días de edad, o individuos adultos de 10 días de edad (Ginjurpalli *et al.*, 2013). En ambos casos observaron que mientras una exposición prolongada inducía la aparición de machos (aunque seguía habiendo hembras entre la descendencia) y reducción del tamaño de las camadas, una exposición puntual inicial permitía una recuperación normal de los animales en tiempos relativamente cortos.

Otros estudios también evaluaron la incidencia de machos presentes en las camadas de dafnias (Abe *et al.*, 2015), y determinaron que a partir de la concentración de 1 µg/L de piriproxifen la prevalencia de machos fue del 100 %. En el presente estudio, contrariamente, incluso en la concentración más alta ensayada (14 veces superior), siguieron apareciendo hembras entre la descendencia. Watanabe *et al.*, (2018), compararon la exposición continua de *D. magna* a 50 ng/L de piriproxifen mediante el ensayo crónico de 21 días, sin ningún impacto en el tamaño de las camadas o alteración en la ratio de machos/hembras en la descendencia, con exposiciones de 2 días de duración a concentraciones de 131 o 525 ng/L en individuos de diferentes edades (desde 0 hasta 15 días). Observaron que en este caso sí se alteraban tanto la proporción de sexos, con un aumento de individuos macho, y el

tamaño de las camadas, con una disminución respecto al grupo control. Olmstead y LeBlanc (2007) observaron que la exposición de juveniles de *D. magna* durante 24 horas a diferentes concentraciones (rango comprendido entre 0.019 y 0.59 µg/L) provocaba la aparición en las camadas posteriores de individuos con ginandromorfismo a concentraciones intermedias. Mientras que a concentraciones bajas solo aparecían hembras, a las más altas solo había presencia de machos, y solo cuando ambos sexos estaban presentes en las camadas aparecían individuos con ginandromorfismo. A pesar de que en el presente estudio la concentración más baja empleada es más de 5 veces superior a la más alta ensayada por estos autores, en todas las camadas hubo presencia de ambos sexos, y en ningún caso se observaron individuos con ginandromorfismo. En línea con los estudios anteriormente mencionados, podría ser que debido a la larga exposición a las que están sometidos los individuos desde su nacimiento, tenga lugar un proceso adaptativo, no induciéndose de forma tan acusada la desaparición de la progenie hembra en nuestro caso.

En relación al estudio de presencia de malformaciones, tras el análisis de los neonatos, tanto en el ensayo individual de F0, como F1, y ensayo conjunto F0, el 100 % de los individuos presentaron como mínimo malformada la espina caudal (extensión incompleta). Como se observó en los individuos que crecieron de la F1, este fenómeno no comprometió su posterior desarrollo, ya que probablemente se corrigió con las sucesivas mudas hasta la fase adulta, aunque sí se observó una reducción en la proporción tamaño espina caudal y tamaño total del individuo.

La bibliografía contrastada asocia los cambios en la coloración de los individuos principalmente como consecuencia de una exposición a ambientes hipóxicos, pasando de una tonalidad pálida a rosada e incluso rojiza, debido al incremento de hemoglobina en los animales para contrarrestar el bajo contenido en oxígeno disuelto del medio (Fox *et al.*, 1951; Pirow *et al.*, 2001). Al igual que ocurría en los ensayos con procloraz, el contenido en oxígeno del medio fue constante en todos los grupos. La fórmula estructural de piriproxifen no presenta ningún grupo que justifique un desequilibrio en el contenido de sales en el individuo, por lo que una posible explicación sería que el propio insecticida estuviese impidiendo a los animales la correcta captación de moléculas de oxígeno, provocándoles un déficit de oxígeno y consecuente cambio de coloración al incrementar el contenido en hemoglobina.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Rider *et al.*, (2005) quienes describieron cómo determinados compuestos podían estimular cascadas neuroendocrinas, tras observar que la exposición de *D. magna* y *D. pulex* durante 48 h a metil farnesoato u otros análogos de la hormona juvenil, entre ellos el piriproxifen (23 – 64 ng/L), inducían como respuesta al estrés un aumento en los niveles de hemoglobina junto con la producción de machos en la descendencia y un cambio de coloración en los progenitores hacia tonos entre amarillentos y rosados.

Por otro lado, la síntesis de hemoglobina inducida por el insecticida piriproxifen actuaría como un mecanismo defensivo frente al estrés tóxico producido por otros compuestos, como hipotetizaron Eytcheson y LeBlanc (2018) al demostrar que la exposición a concentraciones bajas

de piriproxifen (96 ng/L) durante 48 h, reducía la toxicidad del nitrito de sodio presente en el medio como consecuencia de la activación en *D. magna* de la síntesis de hemoglobina, actuando por tanto como mecanismo de defensa frente a éste producto contaminante.

5.4 Efecto sobre la respuesta bioquímica

5.4.1 Efecto sobre el contenido proteico

En el caso de los individuos que se expusieron de forma conjunta al fungicida procloraz, se determinó un aumento en el contenido proteico llegando a ser hasta un 37 % superior, al compararlos con los individuos del grupo control. Sin embargo, en los expuestos a piriproxifen no se registraron alteraciones en el contenido proteico, aunque las dafnias expuestas sí alcanzaron tamaños inferiores a las del grupo control, tras 21 días de exposición.

Autores como McKee y Knowles (1986), sugirieron que un descenso en el contenido proteico estaría asociado a una reducción en el crecimiento de los animales derivado de la exposición al insecticida fenvalerato. De Coen y Janssen (1997), expusieron a concentraciones crecientes del insecticida organoclorado lindano a dafnias durante 96 horas, y observaron cómo a pesar de provocar una disminución significativa en el tamaño de los individuos expuestos a las concentraciones más altas del insecticida, no todos vieron disminuido el contenido proteico en comparación con los animales control. Los resultados presentados, en nuestro caso, tampoco parecen establecer esta relación, pues a pesar de que las hembras expuestas al insecticida

piriproxifen alcanzaron un tamaño promedio un 20 % inferior a los controles, el contenido proteico no presentó diferencias. Sin embargo, en las hembras expuestas a procloraz, con solo un aumento en la longitud del 5 % respecto a las dafnias control, sí se incrementó el contenido proteico hasta un 37 %.

Los resultados obtenidos en las hembras expuestas a procloraz y piriproxifen concuerdan con los obtenidos en los estudios realizados por Gottardi *et al.* (2017), tras exponer a *D. magna* a concentraciones bajas del fungicida azol epoxiconazole o del insecticida piretroide α -cipermetrina. Las madres expuestas al fungicida crecieron en inicio más que las no expuestas, asociado con un mayor contenido proteico. Este crecimiento fue a expensas de tener camadas con individuos más pequeños y numerosos, aunque el contenido proteico de los neonatos no se vio alterado entre los procedentes de madres tratadas y los del grupo control. Sin embargo, al finalizar el ensayo, el tamaño de las hembras expuestas no resultó diferente de las del grupo control. Por contra, las hembras tratadas con α -cipermetrina alcanzaron tamaños inferiores, y el tamaño de los neonatos fue también inferior a los del grupo control. Las respuestas subletales de *D. magna* a los dos pesticidas fueron muy diferentes. A pesar de que la exposición a ambos plaguicidas resultó inicialmente en una descendencia más pequeña, para la α -cipermetrina parecía deberse a un coste energético adicional o la disminución de la alimentación de las madres, mientras que para el epoxiconazol pareció deberse a algún cambio en la asignación de energía, lo que hizo que las madres inicialmente crecieran más rápido en detrimento del tamaño de

la descendencia. Con el tiempo, las madres tratadas con epoxiconazol produjeron más descendientes que las madres no tratadas, aunque en su caso no hubo ninguna compensación aparente en el resto de los parámetros medidos.

De acuerdo con los modelos energéticos fisiológicos y el principio de asignación, para un aporte fijo de recursos, un aumento en los recursos asignados a un proceso fisiológico (crecimiento, reproducción o metabolismo) disminuye los recursos disponibles para los otros dos procesos (Forbes, 2000). En este estudio se sugiere una compensación por la mayor cantidad de recursos asignados a la descendencia en los organismos tratados con epoxiconazole, aunque no se refleje en un aumento final del crecimiento individual. Plantearon la hipótesis de que la energía podía estar menos disponible para el sistema inmunológico, provocando que los organismos tratados con epoxiconazol fuesen más propensos a infecciones y parasitismo, como se observa también para los insecticidas neonicotinoides (Di Prisco *et al.*, 2013). Ello podría ofrecer una posible explicación a los resultados observados en el presente estudio, ya que los efectos observados tanto en nuestro fungicida como en el insecticida se encuentran en línea por los observados por Gottardi *et al.* (2017).

5.4.2 Efecto sobre el metabolismo lipídico

El colesterol es el esteroide principal de los crustáceos, componente estructural indispensable de las membranas celulares. Sirve como

precursor de las hormonas esteroides, como los ecdisteroides, que participan en el proceso de muda (Goad, 1981).

A diferencia de lo determinado con el contenido total proteico, tras el tratamiento con procloraz, el colesterol total en las hembras no mostró diferencias entre los grupos tratados y el grupo control. En contraste, sí se determinó un descenso del colesterol en las hembras expuestas al insecticida, acompañado de un tamaño inferior de los individuos y consecuente menor número de mudas (vinculadas con el crecimiento y las puestas del individuo). Además, las camadas también fueron muy inferiores a las obtenidas en el grupo control. Al comparar las imágenes de las hembras tratadas y no tratadas, se observó que los huevos parecían cualitativamente más grandes en las hembras expuestas a piriproxifen que los de las hembras control. A pesar de que la concentración de alimento se mantuvo constante y fue renovada diariamente durante todo el experimento, podría ser que los animales expuestos a piriproxifen no se alimentasen correctamente.

Gliwicz y Guisande (1992), demostraron que las hembras de dáfidos son capaces de evaluar los niveles de alimentos (cantidad de alimentos) y, en consecuencia, ajustar la asignación fraccional de recursos reproductivos para la descendencia, por ello cuando los compuestos esenciales son escasos, los adultos pueden asignar provisiones adicionales a cada huevo. Establecieron que los niveles altos de alimentos conducen a la producción de camadas más grandes con huevos más pequeños, en contraste con niveles bajos de alimentos que conducen a la producción de camadas pequeñas con huevos más grandes que darán

lugar a una progenie con un mayor contenido de proteína y lípidos siendo más resistentes al hambre. Este fenómeno no solo ocurre ante escasez de alimento, ya que cuando el alimento presenta deficiencias en algún compuesto bioquímico esencial, las dafnias también producen una progenie de mayor tamaño (Martin-Creuzburg *et al.*, 2005).

Elendt (1989) estableció que ante bajas concentraciones de alimento, las reservas lipídicas en la dafnia se metabolizarían en primer lugar, mientras que las proteínas solo serían movilizadas bajo condiciones más severas como largos periodos de ayuno. De esta manera los resultados obtenidos para las dafnias expuestas al insecticida piriproxifen, a pesar de tener un aporte constante de alimento, podrían estar evidenciando una disminución en su capacidad de ingesta y filtración, incorporando menos alimento al organismo y por tanto metabolizando las reservas lipídicas sin llegar a la necesidad de utilizar las proteicas. En el caso de procloraz, aunque las hembras expuestas tuvieron camadas más abundantes que las del grupo control, el contenido en lípidos no se vio alterado, sugiriendo que el aporte extra de energía proviene de otra fuente distinta a la lipídica.

5.4.3 Efecto sobre los niveles de glucosa y la ruta del lactato

En términos generales, la vía glucolítica es considerada la principal vía de generación de energía en los crustáceos, ya que a través de ella los animales son capaces de producir ATP y reducir NADH bajo condiciones anaeróbicas (Chang y O'Connor, 1983). La LDH es la enzima responsable en la vía glucolítica de la conversión reversible del

piruvato en lactato en invertebrados (Stentiford *et al.*, 2001), y según Diamantino *et al.*, (2001) estaría involucrada en la producción de energía, sobre todo cuando ésta se requiere de forma puntual en grandes cantidades.

En este trabajo, ambos plaguicidas produjeron un aumento en la actividad de la enzima LDH. El fungicida procloraz lo provocó en las tres concentraciones más elevadas, mientras que para el insecticida piriproxifen solo se observó este aumento a la más alta. Estos resultados estarían en relación con lo observado en la expresión de los genes involucrados en la síntesis de hemoglobina, ya que ambos plaguicidas indujeron su sobreexpresión, lo que podría estar poniendo de manifiesto que las dafnias no estaban teniendo una captación normal de las moléculas de oxígeno, o su consumo estaba aumentado a causa del estrés producido por la presencia de los plaguicidas en el medio acuático. Wu y Lam (1997) determinaron en *D. magna* la existencia de correlación negativa entre la actividad de LDH con los niveles ambientales de oxígeno, sugiriendo un posible ajuste bioquímico como respuesta a ambientes hipóxicos. El aumento de la actividad LDH estuvo acompañado por una reducción en el lactato y un claro aumento en la glucosa en las hembras expuestas a procloraz. Podía ser indicativo de la necesidad por parte de los organismos de grandes cantidades de energía durante periodos de hipoxia celular causada por el fungicida, por lo que podría asociarse la transformación del lactato en glucosa a este fenómeno, o también podría deberse a una alteración en los recursos

metabólicos necesaria para la producción de más descendencia, o una combinación de ambos en mayor o menor medida.

De Coen *et al.*, 2001, tras exponer a *D. magna* a mercurio observaron que tanto la actividad de la LDH como el contenido en glucosa aumentaron en respuesta a la presencia del tóxico. Zheng *et al.*, 2020, también observaron un incremento en el contenido de glucosa en dafnias tras la exposición al compuesto estrogénico 17 β -estradiol. En otros crustáceos como la gamba *Macrobrachium nipponense*, también se observó un aumento en los niveles de LDH tras exponer a los animales a condiciones de hipoxia (Sun *et al.*, 2018).

En resumen, las alteraciones producidas por cada uno de los compuestos son completamente diferentes. Las reservas energéticas en dafnia son consideradas indicativas de su estado general; mientras que, en condiciones normales las destina de forma equilibrada al metabolismo basal, crecimiento y reproducción, la presencia de un tóxico en su entorno puede desajustar dicho equilibrio. Los efectos finales observados como una menor descendencia o un tamaño inferior del individuo pueden considerarse como el resultado del daño acumulado a nivel suborganístico (Villarreal *et al.*, 2009). Así, la asignación de recursos por parte de las madres expuestas a piriproxifen parecen centrarse en el crecimiento y supervivencia en detrimento de la descendencia, con un gasto energético vinculado a las reservas lipídicas. Sin embargo, las hembras tratadas con procloraz, incrementan sus reservas en proteínas y carbohidratos, en pro de la descendencia en lugar de la supervivencia.

5.5 Efecto sobre la expresión génica

5.5.1 Proteínas de choque térmico

Las proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins, HSP) están involucradas en las fases de plegamiento y estabilización de las proteínas, y en la regulación de la homeostasis celular (Boston *et al.*, 1996; Sitia y Braakman, 2003), por lo que alteraciones en la expresión de los genes asociados se consideran biomarcadores indicativos de una respuesta en general al estrés medioambiental (Rhee *et al.*, 2009).

En las dafnias expuestas a procloraz, no se encontró una sobreexpresión para el gen *hsp90*. La expresión del gen *hsp70* en las dafnias expuestas a la concentración más alta, 380 µg/L, aumentó en promedio un 130 % respecto al grupo control. En las dafnias tratadas con piriproxifen, no se encontraron modificaciones en la expresión del gen *hsp70*. A todas las concentraciones de ensayo se produjo una inhibición en torno al 50 % en la expresión del gen *hsp90*. La sobreexpresión del gen *hsp90* ha sido referida en *D. magna* tras exponerla al retardante de llama trifenil fosfato (500 µg/L) tras 21 días de exposición (Yuan *et al.*, 2018). Y también parece que la inhibición de la expresión en *hsp90* en dafnia se ha relacionado con la exposición a metales pesados. Así, Kim *et al.*, (2017), observaron modificaciones en la expresión de *hsp90* inducidos por la exposición de *D. magna* a mercurio. Los patrones de expresión variaron en función del tiempo de exposición, de manera que exposiciones agudas a mercurio provocaron una sobreexpresión del gen, mientras que con el paso del tiempo se produjo una inhibición del mismo.

La expresión de *hsp70* o *hsp90* se ha relacionado en *Daphnia pulex* con la exposición a microplásticos (Z. Liu *et al.*, 2018). Los autores encontraron una sobreexpresión máxima de ambos genes el día 21 de vida, mientras que a edades inferiores estos genes podrían estar o al mismo nivel o inhibidos respecto a los valores obtenidos en el grupo control.

La sobreexpresión de *Hsp60*, *70* y *90* no solo se observa frente a la presencia de xenobióticos, sino también por la presencia en el medio de predadores (Pauwels *et al.*, 2005), o a modificaciones en la temperatura de la columna de agua. Mikulski *et al.*, (2011) observaron que mientras los machos de dafnia preferían ambientes profundos más estables, pero menos viables para el desarrollo y la reproducción, las hembras optaban por las fases superficiales, con mayores alteraciones térmicas pero más favorables para la reproducción, encontrando sobreexpresión en las hembras, mientras que en los machos los valores se mantenían constantes respecto al grupo control.

5.5.2 Metabolismo de lípidos

En los ensayos realizados con el fungicida procloraz, la expresión de este gen no resultó alterada, acorde con lo observado en la medición de los parámetros bioquímicos colesterol y triglicéridos. Sin embargo, la exposición a piriproxifen sí causó en las dafnias una inhibición en el gen *fabd* que podría estar vinculada a la reducción observada en el contenido en colesterol total, provocando por tanto que los recursos energéticos se

viesen destinados a la supervivencia y crecimiento de los individuos, y no a la reproducción.

Los resultados presentados en este trabajo son contrarios a los de Yuan *et al.*, 2018. Estos autores determinaron que tras exponer a *D. magna* a trifenil fosfato a concentraciones de 500 µg/L durante 21 días, el gen *fabd* aumentaba su expresión respecto al grupo control, asociado a una reducción en la fecundidad y un menor tamaño de las dafnias expuestas. Seyoum *et al.*, (2019) también estudiaron genes relacionados con el metabolismo lipídico en *D. magna*, y aunque la expresión de *fabd* no se modificó respecto al grupo control tras los tratamientos con diferentes ftalatos, otros genes como *magro* o *ceramidasa* si fueron inhibidos por la acción de los tóxicos ensayados; ello asociado a un tamaño individual inferior respecto a los controles.

5.5.3 Vitelogeninas

Vtg1 y *vtg2* son genes que codifican para la síntesis de las principales proteínas precursoras de la síntesis del vitelo, necesario para su maduración (Sun y Zhang, 2015). En las dafnias que fueron expuestas a procloraz no se alteró la expresión de estos genes. Aunque parece que existe una tendencia a la sobreexpresión ésta no fue estadísticamente significativa. Podría deberse a que, en este caso, la expresión de ambos genes esté muy asociada al momento reproductivo en el que se encuentre el individuo (no se hizo distinción entre hembras con la cámara vacía, o hembras con neonatos en la cámara a punto de ser liberados). Contrariamente, en las hembras expuestas a piriproxifen, la expresión de

ambos genes se inhibió más de un 80 % a todas las concentraciones ensayadas, lo que estaría en relación con la baja fecundidad observada en las hembras. Las sustancias alquílicas perfluoradas a concentraciones de 10 y 25 μM también inducen una inhibición en el gen *vtg2*, lo que se asocia a una reducción en el número de neonatos por dafnia, determinado por Seyoum *et al.*, (2020).

La vitelogenina, proteína esencial del vitelo, podría ser estimulada por productos anti-ecdisteroides, como es el caso del procloraz, tal y como demostraron Hannas *et al.*, (2011) en la dafnia, fomentando el desarrollo del huevo. Y no solo el imidazol procloraz, también otros compuestos fungicidas como el tetrazol epoxiconazole afectarían a la esteroidogénesis. Así, Monod *et al.*, (2004) observaron que la maduración de los ovocitos en peces se podía inducir directamente *in vitro* al exponerlos al fungicida. Procloraz parece tener un efecto estrogénico en machos, como determinó el estudio realizado por Maharajan *et al.*, (2020) en pez cebra (*Danio rerio*). Se observó que tras 21 días de exposición a diferentes concentraciones, a la concentración de 100 $\mu\text{g/L}$ las vitelogeninas en plasma de las hembras disminuyeron (21.69 % respecto a los valores control), mientras que aumentaron en machos (16.21 % respecto a los machos control). Contrariamente, en otros estudios realizados con los fungicidas fenarimol y propiconazole se observó una inhibición en la expresión de estos genes (Soetaert *et al.*, 2006; Soetaert *et al.*, 2007). Es por ello que la vitelogenina es considerada un potencial biomarcador de altera temprana para predecir posibles efectos reproductivos en los dáfnidos expuestos a diferentes plaguicidas.

5.5.4 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo celular tiene lugar cuando la presencia de radicales libres de oxígeno (ROS) alcanza concentraciones superiores a las que la célula es capaz de neutralizar de forma natural (Flora, 2009). La transcripción de genes implicados en estas rutas antioxidantes incluye los genes para la transcripción de glutatión-S-transferasa (*gst*) y catalasa (*cat*), dos de las principales enzimas antioxidantes funcionales empleados por muchos organismos acuáticos para minimizar los efectos nocivos producidos por los ROS (Yu *et al.*, 2018). En consecuencia, las alteraciones en su expresión se consideran marcadores de estrés oxidativo producido por cambios medioambientales negativos (Valavanidis *et al.*, 2006). Las enzimas antioxidantes CAT y GST participan en la detoxificación del H₂O₂, ya que actuarían sinérgicamente convirtiéndola en agua y oxígeno, contrarrestando así el daño inducido por los radicales libres (Y. Liu *et al.*, 2018)

GST juega un papel clave en la síntesis de enzimas de fase II relacionadas con la detoxificación de sustancias electrofílicas. Estudios previos realizados por Liu *et al.*, (2013) demostraron que esta enzima está asociada con la peroxidación lipídica, y daños en el ADN. Es por ello que tanto su actividad como su expresión se utilizan ampliamente como biomarcadores para evaluar la oxidación como condición estresante en organismos acuáticos (Carvalho *et al.*, 2012; Won *et al.*, 2012).

La exposición de las dafnias a procloraz a las concentraciones ensayadas no llegó a provocar alteraciones estadísticamente significativas, aunque se observó una tendencia inhibitoria derivada de la exposición. Otros xenobióticos como los ftalatos, sí han mostrado la inhibición en la expresión de ambos genes en *D. magna* a diferentes concentraciones (Wang *et al.*, 2018; Seyoum *et al.*, 2019). En las dafnias expuestas a piriproxifen, tampoco se observaron alteraciones en la expresión del gen *gst* tras 21 días a diferentes concentraciones del insecticida. En otras especies como *D. pulex* se ha observado un aumento en la actividad de GST por la exposición a piriproxifen a la concentración ensayada (2 µg/L) (Kim *et al.*, 2017). También la presencia de microplásticos en el medioambiente como observaron Z. Liu *et al.*, (2018) parece afectar en la expresión en *D. magna* de diferentes edades, inhibiendo su expresión o sobreexpresándolos. Parece que la inhibición estaría en relación a las edades de juveniles de 7 y 14 días para el gen *GST*, mientras que la sobreexpresión se relacionaría con edades muy tempranas (24 – 96 horas) y tardías (21 días). Para el gen *CAT* se observó una gran sobreexpresión y solo tras la exposición a los 21 días de edad de las dafnias.

5.5.5 Metalotioneínas

Las metalotioneínas son unas proteínas de bajo peso molecular, que pertenecen a una familia rica en cisteínas, y juegan un papel importante tanto en la prevención de la toxicidad producida por metales, como por otros oxidantes dañinos (Janssens *et al.*, 2009).

En los ensayos con el fungicida procloraz se observó una reducción significativa en la expresión de *mt-b* para concentraciones crecientes de tóxico con un promedio en torno al 65 %. A diferencia de lo que ocurre en las dafnias expuestas al insecticida piriproxifen, donde en ningún tratamiento se determinó alguna alteración. Numerosos estudios han relacionado la inhibición en estos genes con el aumento a la toxicidad producida por metales, estrés oxidativo, y su vinculación con desequilibrios metabólicos (Sato *et al.*, 2010; Rodríguez-Menéndez *et al.*, 2018). También Seyoum *et al.*, (2020), observaron una inhibición en los tres genes producida por sustancias alquílicas perfluoradas a concentraciones de 10 y 25 μM tras exponer a dafnia.

5.5.6 Hemoglobina

La hemoglobina es el pigmento respiratorio presente en la hemolinfa en *D. magna*, Se induce principalmente en situaciones de hipoxia, y puede ser estimulada por variaciones en la presión parcial del oxígeno (Po_2) en los líquidos circulatorios. Su síntesis tiene lugar en las células grasas y en las células epiteliales de los apéndices antenales (Goldmann *et al.*, 1999). El transporte de oxígeno en la hemolinfa está regulado para adaptarse a las variaciones de Po_2 medioambientales a las que se enfrentan los animales (Zeis *et al.*, 2003). En 2001, Weber y Vinogradov observaron como las dafnias expuestas a condiciones de hipoxia, presentaban mayor concentración de hemoglobina, y ésta tenía mayor afinidad por el O_2 , que la hemoglobina de las dafnias en condiciones de normoxia.

Respecto a los genes *hbl* y *hb2*, los principales estudios sobre su expresión se hacen en relación con la Po_2 del medioambiente o con variaciones en la temperatura medioambiental (Cuenca-Cambronero *et al.*, 2018), y también como biomarcador de contaminación por diferentes tóxicos. Ya se ha observado anteriormente sobreexpresión de estos genes al exponer a individuos de *D. magna* a distintas concentraciones del fungicida fenarimol (Soetaert *et al.*, 2007). Ha y Choi (2009), estudiaron las alteraciones producidas en los genes involucrados en la síntesis de la hemoglobina en *D. magna* expuesta a diferentes sustancias como nonilfenol, bisfenol A, clorpirifós, o nitrato de plomo entre otros. Observaron que efectivamente, se producía una sobreexpresión de estos genes en presencia de tóxicos. Aunque no se pudo establecer una correlación entre los parámetros reproductivos y su expresión, ya que los productos tóxicos ensayados actuaban de forma diferente. Mientras bisfenol A tenía una correlación de manera directa, otros como nonilfenol, lo hacían de forma inversamente proporcional. Nuestros resultados estarían en línea con los obtenidos por Rider *et al.*, (2005) quienes ya plantearon que la síntesis de hemoglobina podía ser regulada por rutas endocrinas como respuesta a señales medioambientales por compuestos análogos de la hormona juvenil como el metil farnesoato o el piriproxifen durante cortos periodos de exposición en *D. magna*.

En el caso de piriproxifen la bibliografía avala dichos cambios y daría explicación a los mecanismos de activación. Pero en nuestro estudio con procloraz no está tan claro. No se han encontrado referencias al respecto. Podría estar relacionada con la formulación del propio compuesto o sus

metabolitos, modificando los mecanismos de captura de las moléculas de oxígeno, provocando en el individuo una condición de hipoxia y obligándolo por tanto a aumentar la concentración de hemoglobina para compensar ese déficit en la incorporación de O₂, y que se haría evidente por el cambio en la coloración de los individuos.

En este sentido, tanto en las dafnias expuestas a procloraz como a piriproxifen, el aumento en la expresión de ambos genes estaría en relación con el aumento observado de los niveles enzimáticos de LDH para ambos tratamientos. Wu y Lam (1997), concluyeron que podía existir una correlación entre la actividad enzimática de LDH y la concentración de oxígeno presente en el medio, cuando investigaron los niveles de LDH en el mejillón verde asiático (*Perna viridis*) como biomarcador de ambientes hipóxicos.

6. Conclusiones

6 CONCLUSIONES

1. El ensayo de toxicidad aguda con procloraz en *D. magna* evidenció que el fungicida no presentó una elevada toxicidad, además de registrarse la mayor acción aguda del tóxico durante las primeras 24 horas de exposición.
2. Los resultados obtenidos tras exposición aguda del crustáceo *D. magna* al insecticida piriproxifen evidenciaron su elevada toxicidad. Además, el efecto tóxico producido tras 48 horas resultó potenciado respecto a las 24 horas.
3. Ninguna de las concentraciones subletales ensayadas de cada plaguicida afectó al comportamiento alimenticio de los neonatos de *D. magna* expuestos durante 5 horas.
4. En el ensayo crónico de la generación F0 el fungicida procloraz no mostró efectos adversos significativos. Sin embargo, el ensayo sobre la generación F1 puso de manifiesto que podía estar teniendo lugar una transmisión vertical de la toxicidad en ambos grupos (TL y TT), junto con un efecto antiandrogénico causado por el fungicida (grupo TT) ya que varios parámetros reproductivos se vieron incrementados tras la exposición reiterada.

5. Los individuos expuestos de forma conjunta procedentes de la generación F0 de *D. magna* para procloraz vieron potenciados e incluso adelantados los efectos observados en los parámetros reproductivos que pudieron estudiarse frente a la exposición individual de la generación F0 y F1.
6. La exposición conjunta de *D. magna* al fungicida procloraz puso de manifiesto que los individuos se volvían más sensibles a lo largo del ensayo conforme aumentó la concentración de tóxico, al aumentar la mortalidad conforme lo hizo la concentración de exposición.
7. En la progenie de las dafnias expuestas al fungicida el número de neonatos malformados aumentó conforme lo hizo la concentración de exposición.
8. Procloraz causó un aumento de los requerimientos energéticos de los animales expuestos al tóxico, evidenciado por la activación de la gluconeogénesis al disminuir significativamente la concentración de lactato y aumentar las reservas de glucosa.
9. El aumento de la actividad LDH junto con sobreexpresión de los genes implicados en la síntesis de la hemoglobina en los individuos expuestos al fungicida manifestaron la necesidad

extra de oxígeno por parte de los animales, aunque no está claro el motivo que derivó el déficit del mismo.

10. La exposición a procloraz alteró la expresión de varios genes relacionados con los procesos de destoxificación y estabilización de las proteínas.
11. En el ensayo crónico con la generación F0 de *D. magna*, tras la exposición al insecticida piriproxifen todos los parámetros reproductivos se vieron disminuidos. El tamaño alcanzado por los individuos también se vio comprometido al reducirse significativamente respecto a los individuos control.
12. El ensayo sobre la generación F1 con piriproxifen mostró que, en los individuos hembra procedentes de madres expuestas, tras eliminar el tóxico del medio, se produjo una alta recuperación en todos los parámetros, llegando algunos incluso a valores equivalentes al control. Sin embargo, no se incrementó significativamente la toxicidad en los individuos que se sometieron de nuevo al insecticida respecto a los valores obtenidos para sus madres. La tasa intrínseca de crecimiento natural (r) no resultó ser un buen indicador en el caso de la contaminación por piriproxifen en *D. magna*, ya que en su cálculo no se tiene en cuenta la ratio de sexos.

13. La generación F0 de *D. magna* expuesta conjuntamente al insecticida piriproxifen resultó afectada en el mismo grado que el observado en la exposición individual.
14. La exposición a piriproxifen indujo la aparición de machos en las camadas procedentes de las madres tratadas con el insecticida en las tres modalidades de ensayo. Lo que pone de manifiesto el estrés medioambiental inducido por el insecticida en los dáfnidos expuestos.
15. Todas las camadas procedentes de dafnias expuestas a piriproxifen sufrieron malformaciones en distintos grados, mostrándose así el efecto de este compuesto en el desarrollo de *D. magna*.
16. La exposición a piriproxifen produjo un descenso en el contenido de colesterol de los individuos, junto con una inhibición en el gen *fabd* implicado en las rutas lipídicas, indicando que el metabolismo de los lípidos estaba alterado.
17. La exposición a piriproxifen inhibió significativamente la expresión de los genes involucrados en la síntesis de vitelogenina, mientras que sobreexpresó los genes implicados en la síntesis de hemoglobina.

7. Bibliografía

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abe, R., Watanabe, H., Yamamuro, M., Iguchi, T., y Tatarazako, N. (2015). Establishment of a short-term, in vivo screening method for detecting chemicals with juvenile hormone activity using adult *Daphnia magna*: In vivo screening method for detecting juvenile hormone activity. *J Appl Toxicol*, 35(1), 75–82. doi: <https://doi.org/f6tmrh>
- Abe, T., Saito, H., Niikura, Y., Shigeoka, T., y Nakano, Y. (2001). Embryonic development assay with *Daphnia magna*: application to toxicity of aniline derivatives. *Chemosphere*, 45(4–5), 487–495. doi: <https://doi.org/d9b5bb>
- Ademollo, N., Patrolecco, L., Rauseo, J., Nielsen, J., y Corsolini, S. (2018). Bioaccumulation of nonylphenols and bisphenol A in the Greenland shark *Somniosus microcephalus* from the Greenland seawaters. *Microchem J*, 136, 106–112. doi: <https://doi.org/gcvt>
- Agatz, A., y Brown, C. D. (2013). Evidence for links between feeding inhibition, population characteristics, and sensitivity to acute toxicity for *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol*, 47(16), 9461–9469. doi: <https://doi.org/f5fcdd>
- Allan, J. D., y Daniels, R. E. (1982). Life table evaluation of chronic exposure of *Eurytemora affinis* (Copepoda) to Kepone. *Mar Biol*, 66(2), 179–184. doi: <https://doi.org/bcnkg9>
- Allen, Y., Calow, P., y Baird, D. J. (1995). A mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem*, 14(9), 1625–1630. doi: <https://doi.org/cfkfvq>
- Alonso, M. (1996). “Fauna Iberica”. Volúmen 7 - Crustacea Branchiopoda. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC: Eds Ramos M.A. Madrid. ISBN: 84-00-07571-4.
-

-
- Andersen, H. R., Vinggaard, A. M., Rasmussen, T. H., Gjermandsen, I. M., y Bonefeld-Jørgensen, E. C. (2002). Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*, 179(1), 1–12. doi: <https://doi.org/bq6j3f>
- Araujo, G. S., Pinheiro, C., Pestana, J. L. T., Soares, A. M. V. M., Abessa, D. M. S., y Loureiro, S. (2019). Toxicity of lead and mancozeb differs in two monophyletic *Daphnia* species. *Ecotox Environ Safe*, 178, 230–238. doi: <https://doi.org/gc2m>
- Azevedo-Linhares, M., Souza, A. T. C., Lenz, C. A., Leite, N. F., Brito, I. A., Folle, N. M. T., ... Oliveira Ribeiro, C. A. (2018). Microcystin and pyriproxyfen are toxic to early stages of development in *Rhamdia quelen*: An experimental and modelling study. *Ecotox Environ Safe*, 166, 311–319. doi: <https://doi.org/gc2n>
- Baillieul, M., Bervoets, L., Blust, R., y De Boeck, G. (1993). Assessment of the toxicity of an industrial effluent with a two-generation reproduction test using *Daphnia magna*. *Sci Total Environ*, 134, 1159–1164. doi: <https://doi.org/bt5j3d>
- Barata, C., Varo, I., Navarro, J. C., Arun, S., y Porte, C. (2005). Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp Biochem Physiol*, 140(2), 175–186. doi: <https://doi.org/bqk5gt>
- Baudo, R. (1987). Ecotoxicological testing with *Daphnia*. *Mem Ist Ital Idrobiol*, 45, 461–482. doi: N/D
- Bekker, E. I., Karabanov, D. P., Galimov, Y. R., Haag, C. R., Neretina, T. V., y Kotov, A. A. (2018). Phylogeography of *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Cladocera) in Northern Eurasia: Evidence for a deep longitudinal split between mitochondrial lineages. *PloS One*, 13(3), e0194045. doi: <https://doi.org/gc69xn>
-

-
- Benzie, J. A. H. (2005). Cladocera: The Genus DAPHNIA (including DAPHNIOPSIS) (Anomopoda: Daphniidae). Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World. *Q Rev Biol*, 21(4), 491–491. doi: <https://doi.org/cqd46q>
- Biale, H., Geden, C. J., y Chiel, E. (2017). Effects of pyriproxyfen on wild populations of the housefly, *Musca domestica*, and compatibility with its principal parasitoids. *Pest Manag Sci*, 73(12), 2456–2464. doi: <https://doi.org/gc2p>
- Bischoff, H.W. y Bold, H. C. (1963). Physiological studies IV. Some algae from enched rock and relate algae species. Ed. Koenigstein, Ger. ISBN: 3874290996
- Bo, L., Shengen, y Z., Chang, C. (2016). Emerging pollutants - part II: Treatment. *Water Environment Research: A Research Publication of the Water Environ Res*, 88(10), 1876–1904. doi: <https://doi.org/ggrpx2>
- Bodar, C. W., van der Sluis, I., Voogt, P. A., y Zandee, D. I. (1988). Effects of cadmium on consumption, assimilation and biochemical parameters of *Daphnia magna*: possible implications for reproduction. *Comp Biochem Physiol*, 90(2), 341–346. doi: <https://doi.org/bvfr88>
- Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., y Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 239(1–3), 229–246. doi: <https://doi.org/dr3drh>
- Boston, R. S., Viitanen, P. V., y Vierling, E. (1996). Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol Biol*, 32(1–2), 191–222. doi: <https://doi.org/fqs25m>
- Boulinier, T., y Staszewski, V. (2008). Maternal transfer of antibodies: raising immuno-ecology issues. *Trends Ecol Evol*, 23(5), 282–288. doi: <https://doi.org/dq2sdg>
-

-
- Brooks, J. L. (1957). The systematics of North American *Daphnia*. Ed. New Haven. ISBN: 1258657651
- Brown, M. D., Thomas, D., Watson, K., Greenwood, J. G., y Kay, B. H. (1996). Acute toxicity of selected pesticides to the estuarine shrimp *Leander tenuicornis* (Decapoda: Palaemonidae). *J Am Mosq Control Assoc*, 12(4), 721–724. doi: N/D
- Buikema, A. L., Geiger, J. G., y Lee, D. R. (2009). *Daphnia* toxicity tests. In *Aquatic Invertebrate Bioassays*, pp. 48-69. doi: <https://doi.org/bpshgj>
- Calow, P. (1993). General principles and overview. *Handbook of Ecotoxicology*. Vol. I. O. Calow ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford. doi: <https://doi.org/dtv5zt>.
- Campo, J., Masiá, A., Blasco, C., y Picó, Y. (2013). Occurrence and removal efficiency of pesticides in sewage treatment plants of four Mediterranean River Basins. *J Hazard Mater*, 263, 146–157. doi: <https://doi.org/f5rjqk>
- Capó-Martí, M. (2002). Principios de ecotoxicología: diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente. Ed: McGraw-Hill, España. ISBN: 84-481-3672-1
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llombart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., ... Ternes, T. (2004). Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res*, 38(12), 2918–2926. doi: <https://doi.org/bnjr2p>
- Carvalho, C. S., Bernusso, V. A., de Araújo, H. S. S., Espíndola, E. L. G., y Fernandes, M. N. (2012). Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*, 89(1), 60–69. doi: <https://doi.org/f34dvj>
- Ccanccapa, A., Masiá, A., Andreu, V., y Picó, Y. (2016a). Spatio-temporal patterns of pesticide residues in the Turia and Júcar Rivers (Spain). *Sci Total Environ*, 540, 200–210. doi: <https://doi.org/gc2s>
-

-
- Ccauccapa, A., Masiá, A., Navarro-Ortega, A., Picó, Y., y Barceló, D. (2016b). Pesticides in the Ebro River basin: Occurrence and risk assessment. *Environ Pollut*, 211, 414–424. doi: <https://doi.org/f8p9s8>
- Chang, E. S., y O'Connor, J. D. (1983). Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. Ed. *Internal Anatomy and Physiological Regulation*. Academic Press, 263–287. doi: <https://doi.org/gc2v>
- Christensen, B. T., Lauridsen, T. L., Ravn, H. W., y Bayley, M. (2005). A comparison of feeding efficiency and swimming ability of *Daphnia magna* exposed to cypermethrin. *Aquat Toxicol*, 73(2), 210–220. doi: <https://doi.org/d8xgkm>
- Coakley, C. M., Nestoros, E., y Little, T. J. (2018). Testing hypotheses for maternal effects in *Daphnia magna*. *J Evol Biol*, 31(2), 211–216. doi: <https://doi.org/gckpcj>
- Coelho, S., Oliveira, R., Pereira, S., Musso, C., Domingues, I., Bhujel, R. C., ... Nogueira, A. J. A. (2011). Assessing lethal and sub-lethal effects of trichlorfon on different trophic levels. *Aquat Toxicol*, 103(3–4), 191–198. doi: <https://doi.org/d3w7zw>
- Copping, L. G., y Hewitt, H. G. (1998). *Chemistry and mode of action of crop protection agents*. Cambridge, England. Royal Society of Chemistry. doi: <https://doi.org/fdd9r8>
- Corcoran, J., Winter, M. J., y Tyler, C. R. (2010). Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish. *Crit Rev Toxicol*, 40(4), 287–304. doi: <https://doi.org/b8bfbs>
- Cotou, E. (1993). The controlled production of dormant eggs of *Daphnia pulex* (Leydig) as biological starting material for testing. Tesis doctoral. Universidad de Gante, Bélgica.
-

-
- Cuenca Cambroneró, M., Zeis, B., y Orsini, L. (2018). Haemoglobin-mediated response to hyper-thermal stress in the keystone species *Daphnia magna*. *Evol Appl*, 11(1), 112–120. doi: <https://doi.org/gctfw5>
- Day, K., y Kaushik, N. K. (1987). Short-term exposure of zooplankton to the synthetic pyrethroid, fenvalerate, and its effects on rates of filtration and assimilation of the alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 16(4), 423–432. doi: <https://doi.org/brn955>
- De Castro-Català, N., Muñoz, I., Riera, J. L., y Ford, A. T. (2017). Evidence of low dose effects of the antidepressant fluoxetine and the fungicide prochloraz on the behavior of the keystone freshwater invertebrate *Gammarus pulex*. *Environ Pollut*, 231(1), 406–414. doi: <https://doi.org/gck5p5>
- De Coen, W. M., y Janssen, C. R. (1997). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *J Aquat Ecosys Stress Recovery*, 6(1), 43–55. doi: <https://doi.org/ccktgp>
- De Coen, W. M., Janssen, C. R., y Segner, H. (2001). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing V. In vivo alterations in the carbohydrate metabolism of *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of mercury and lindane. *Ecotox Environ Safe*, 48(3), 223–234. doi: <https://doi.org/c3w7wx>
- De Coen, W. M., y Janssen, C. R. (2003). 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(7), 1632–1641. doi: <https://doi.org/fhzxtw>
- De Gelas, K., y De Meester, L. (2005). Phylogeography of *Daphnia magna* in Europe. *Mol Ecol*, 14(3), 753–764. doi: <https://doi.org/cvfvkv>
-

-
- De Oliveira, M., Frihling, B. E. F., Velasques, J., Filho, F. J. C. M., Cavalheri, P. S., y Migliolo, L. (2020). Pharmaceuticals residues and xenobiotics contaminants: Occurrence, analytical techniques and sustainable alternatives for wastewater treatment. *Sci Total Environ*, 705, 135568. doi: <https://doi.org/gc2w>
- Devi, N. L., Yadav, I. C., Raha, P., Shihua, Q., y Dan, Y. (2015). Spatial distribution, source apportionment and ecological risk assessment of residual organochlorine pesticides (OCPs) in the Himalayas. *Environ Sci Pollut Res*, 22(24), 20154–20166. doi: <https://doi.org/f74m5d>
- Dhadialla, T. S., Carlson, G. R., y Le, D. P. (1998). New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu Rev Entomol*, 43(1), 545–569. doi: <https://doi.org/c2m52n>
- Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., ... Pennacchio, F. (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *PNAS USA*, 110(46), 18466–18471. doi: <https://doi.org/f5gg9v>
- Diamantino, T. C., Almeida, E., Soares, A. M., y Guilhermino, L. (2001). Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* Straus. *Chemosphere*, 45(4–5), 553–560. doi: <https://doi.org/dd8mcp>
- Díaz, S., Settele, J., Brondízio, E., Ngo, H., Guèze, M., Agard, J., ... Zayas, C. (2019). Summary for Policymakers of the Global Assessment Report on Biodiversity and Ecosystem Services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. *IPBES*, 45(3): 453-699. doi: <https://doi.org/ghfbnv>
- Dzieciolowska, S., Larroque, A.L., Kranjec, E.A., Drapeau, P., y Samarut, E. (2017). The larvicide pyriproxyfen blamed during the Zika virus outbreak does not cause microcephaly in zebrafish embryos. *Sci Rep*, 7(1), 40067. doi: <https://doi.org/gc2x>
-

-
- Ebert, D. (2005). Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in *Daphnia*. NCBI. ISBN: 1-932811-06-0
- Elendt, B. P. (1989). Effects of starvation on growth, reproduction, survival and biochemical composition of *Daphnia magna*. Arch Hydrobiol, 116, 415-433. doi: N/D
- Elvia, L. F., Sioban, H. D., Bernardo, H. P., y Carillo Constanza, S. (2000). Organochlorine pesticide exposure in rural and urban areas in Mexico. J Expo Sci Environ Epidemiol, 10(4), 394–399. doi: <https://doi.org/fd7jm2>
- Enserink, L., Luttmmer, W., y Maas-Diepeveen, H. (1990). Reproductive strategy of *Daphnia magna* affects the sensitivity of its progeny in acute toxicity tests. Aquat Toxicol, 17(1), 15–25. doi: <https://doi.org/fc6mnj>
- Eytcheson, S. A., y LeBlanc, G. A. (2018). Hemoglobin Levels Modulate Nitrite Toxicity to *Daphnia magna*. Sci Rep, 8(1), 1–8. doi: <https://doi.org/gdjn9z>
- Fairchild, J. F., Little, E. E., y Huckins, J. N. (1992). Aquatic hazard assessment of the organophosphate insecticide fonofos. Arch Environ Contam Toxicol, 22(4), 375–379. doi: <https://doi.org/d3jpdg>
- Fernández-Casalderrey, A., Ferrando, M. D., y Andreu-Moliner, E. (1994). Effect of sublethal concentrations of pesticides on the feeding behavior of *Daphnia magna*. Ecotox Environ Safety, 27(1), 82–89. doi: <https://doi.org/dtnwn>
- Fernández-Casalderrey, A., Ferrando, M. D., y Andreu-Moliner, E. (1995). Chronic toxicity of methylparathion to *Daphnia magna*: effects on survival, reproduction, and growth. Bull Environ Contam Toxicol, 54(1), 43–49. doi: <https://doi.org/dp8f7k>
- Ferrando, M. D., Janssen, C. R., Andreu, E., y Persoone, G. (1993). Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. III. The effects of chemicals on the feeding behavior. Ecotox Environ Safe, 26(1), 1–9. doi: <https://doi.org/fjxdc>
-

-
- Ferrando, M. D., Sancho, E., y Andreu-Moliner, E. (1996). Chronic toxicity of fenitrothion to an algae (*Nannochloris oculata*), a rotifer (*Brachionus calyciflorus*), and the cladoceran (*Daphnia magna*). *Ecotox Environ Safe*, 35(2), 112–120. doi: <https://doi.org/c774gm>
- Fields, P. D., Reisser, C., Dukić, M., Haag, C. R., y Ebert, D. (2015). Genes mirror geography in *Daphnia magna*. *Mol Ecol*, 24(17), 4521–4536. doi: <https://doi.org/f7p5c4>
- Flora, S. J. S. (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev*, 2(4), 191–206. doi: <https://doi.org/fw357j>
- Forbes, V. E. (2000). Is hormesis an evolutionary expectation? *Funct Ecol*, 14(1), 12–24. doi: <https://doi.org/b9cf99>
- Fox, H. M., Gilchrist, B. M., y Phear, E. A. (1951). Functions of haemoglobin in *Daphnia*. *Proc Biol Sci*, 138(893), 514–528. doi: <https://doi.org/c36xgz>
- Gagné, F., Blaise, C., y André, C. (2006). Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotox Environ Safe*, 64(3), 329–336. doi: <https://doi.org/d5pcdr>
- Gauld, D. T. (1951). The grazing rate of planktonic copepods. *J Mar Biol Ass*, 29(3), 695–706. doi: <https://doi.org/frvqkk>
- Geller, W., y Müller, H. (1981). The filtration apparatus of Cladocera: Filter mesh-sizes and their implications on food selectivity. *Oecologia*, 49(3), 316–321. doi: <https://doi.org/c3m98k>
- Ginjupalli, G. K., y Baldwin, W. S. (2013). The time- and age-dependent effects of the juvenile hormone analog pesticide, pyriproxyfen on *Daphnia magna* reproduction. *Chemosphere*, 92(9), 1260–1266. doi: <https://doi.org/f46vjj>
- Ginzburgh, L. R. (1998). Maternal effects as adaptations. Capítulo 3. Population Dynamics Based on Maternal Effects. “Inertial growth: population dynamics
-

based on maternal effects". Oxford University press, Oxford.
ISBN: 9780195344400

Glezen, W. P. (2003). Effect of maternal antibodies on the infant immune response. *Vaccine*, 21(24), 3389–3392. doi: <https://doi.org/cncxnw>

Gliwicz, Z. M., y Guisande, C. (1992). Family planning in *Daphnia*: resistance to starvation in offspring born to mothers grown at different food levels. *Oecologia*, 91(4), 463–467. doi: <https://doi.org/b626tt>

Goad, L. J. (1981). Sterol biosynthesis and metabolism in marine invertebrates. *Pure Appl Chem*, 53(4), 837–852. doi: <https://doi.org/c9j2n7>

Goldmann, T., Becher, B., Wiedorn, K. H., Pirow, R., Deutschbein, M. E., Vollmer, E., y Paul, R. J. (1999). Epipodite and fat cells as sites of hemoglobin synthesis in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*. *Histochem Cell Biol*, 112(5), 335–339. doi: <https://doi.org/fn9dh2>

Gómez-Hernández, E. (2008). Evolución histórica de las materias activas fungicidas de postcosecha. *Phytohemeroteca* ed. 201. doi: N/D

González-Arias, C. A., de Lourdes Robledo-Marengo, M., Medina-Díaz, I. M., Velázquez-Fernández, J. B., Girón-Pérez, M. I., Quintanilla-Vega, B., ... Rojas-García, A. E. (2010). Patrón de uso y venta de plaguicidas en Nayarit, México. *Rev Int Contam Ambie*, 26(3), 221–228. ISSN: 0188-4999

Gottardi, M., Birch, M. R., Dalhoff, K., y Cedergreen, N. (2017). The effects of epoxiconazole and α -cypermethrin on *Daphnia magna* growth, reproduction, and offspring size. *Environ Toxicol Chem*, 36(8), 2155–2166. doi: <https://doi.org/gbpptz>

Gottardi, M., y Cedergreen, N. (2019). The synergistic potential of azole fungicides does not directly correlate to the inhibition of cytochrome P450 activity in aquatic invertebrates. *Aquat Toxicol*, 207, 187–196. doi: <https://doi.org/gc59>

-
- Graney, R. L., y Giesy, J. P., Jr. (1986). Effects of long-term exposure to pentachlorophenol on the free amino acid pool and energy reserves of the freshwater amphipod *Gammarus pseudolimnaeus* bousfield (crustacea, amphipoda). *Ecotox Environ Safe*, 12(3), 233–251. doi: <https://doi.org/fjj9pj>
- Ha, M.-H., y Choi, J. (2009). Effects of environmental contaminants on hemoglobin gene expression in *Daphnia magna*: a potential biomarker for freshwater quality monitoring. *Arch Environ Contam Toxicol*, 57(2), 330–337. doi: <https://doi.org/dfnpzc>
- Hallam, T. G., Lassiter, R. R., Li, J., y Suarez, L. A. (1990). Modelling individuals employing an integrated energy response: Application to *Daphnia*. *Ecology*, 71(3), 938–954. doi: <https://doi.org/b8fw5c>
- Hammers-Wirtz, M., y Ratte, H. T. (2000). Offspring fitness in *Daphnia*: Is the *Daphnia* reproduction test appropriate for extrapolating effects on the population level? *Environ Toxicol Chem*, 19(7), 1856–1866. doi: <https://doi.org/frqgr6>
- Hanazato, T. (1998). Growth analysis of *Daphnia* early juvenile stages as an alternative method to test the chronic effect of chemicals. *Chemosphere*, 36(8), 1903–1909. doi: <https://doi.org/crgdt2>
- Hannas, B. R., Wang, Y. H., Thomson, S., Kwon, G., Li, H., y Leblanc, G. A. (2011). Regulation and dysregulation of vitellogenin mRNA accumulation in daphnids (*Daphnia magna*). *Aquat Toxicol*, 101(2), 351–357. doi: <https://doi.org/cv82bk>
- Hartmann, H. J., y Kunkel, D. D. (1991). Mechanisms of food selection in *Daphnia*. *Hydrobiologia*, 225(1), 129–154. doi: <https://doi.org/c22d7n>
- Haselman, J. T., Kosian, P. A., Korte, J. J., Olmstead, A. W., y Degitz, S. J. (2018). Effects of multiple life stage exposure to the fungicide prochloraz in *Xenopus*
-

-
- laevis*: Manifestations of antiandrogenic and other modes of toxicity. *Aquat Toxicol*, 199, 240–251. doi: <https://doi.org/gdnswr>
- Hassold, E., y Backhaus, T. (2009). Chronic toxicity of five structurally diverse demethylase-inhibiting fungicides to the crustacean *Daphnia magna*: a comparative assessment. *Environ Toxicol Chem*, 28(6), 1218–1226. doi: <https://doi.org/fmm5jv>
- Hassold, E., y Backhaus, T. (2014). The predictability of mixture toxicity of demethylase inhibiting fungicides to *Daphnia magna* depends on life-cycle parameters. *Aquat Toxicol*, 152, 205–214. doi: <https://doi.org/f24brv>
- Hebert, P. D. N. (1978). The population biology of *Daphnia* (Crustacea, daphnidae). *Biol Rev Camb Philos Soc*, 53(3), 387–426. doi: <https://doi.org/ccvg7q>
- Heckmann, L.H., Connon, R., Hutchinson, T. H., Maund, S. J., Sibly, R. M., y Callaghan, A. (2006). Expression of target and reference genes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. *BMC Genomics*, 7(1), 175. doi: <https://doi.org/cqbwqv>
- Henry, M. J., y Sisler, H. D. (1984). Effects of sterol biosynthesis-inhibiting (SBI) fungicides on cytochrome P-450 oxygenations in fungi. *Pesticide Biochem Physiol*, 22(3), 262–275. doi: <https://doi.org/dqvttx>
- Hernando, M. D., Ejerhoon, M., Fernández-Alba, A. R., y Chisti, Y. (2003). Combined toxicity effects of MTBE and pesticides measured with *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* bioassays. *Water Res*, 37(17), 4091–4098. doi: <https://doi.org/d6kx6m>
- Horton, A. A., Vijver, M. G., Lahive, E., Spurgeon, D. J., Svendsen, C., Heutink, R., ... Baas, J. (2018). Acute toxicity of organic pesticides to *Daphnia magna* is unchanged by co-exposure to polystyrene microplastics. *Ecotox Environ Safe*, 166, 26–34. doi: <https://doi.org/gc9w>
-

-
- Jaffer, A., Protopopoff, N., Mosha, F. W., Malone, D., Rowland, M. W., y Oxborough, R. M. (2015). Evaluating the sterilizing effect of pyriproxyfen treated mosquito nets against *Anopheles gambiae* at different blood-feeding intervals. *Acta Trop*, 150, 131–135. doi: <https://doi.org/f7vh9s>
- Jambulingam, P., Sadanandane, C., Boopathi Doss, P. S., Subramanian, S., y Zaim, M. (2008). Field evaluation of an insect growth regulator, pyriproxyfen 0.5 % GR against *Culex quinquefasciatus*, the vector of *Bancroftian filariasis* in Pondicherry, India. *Acta Tropica*, 107(1), 20–24. doi: <https://doi.org/dcqvjh>
- Jansen, M., Vergauwen, L., Vandenbrouck, T., Knapen, D., Dom, N., Spanier, K. I., ... De Meester, L. (2013). Gene expression profiling of three different stressors in the water flea *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, 22(5), 900–914. doi: <https://doi.org/f46cqq>
- Janssens, T. K. S., Roelofs, D., y van Straalen, N. M. (2009). Molecular mechanisms of heavy metal tolerance and evolution in invertebrates. *Insect Sci*, 16(1), 3–18. doi: <https://doi.org/d99v9t>
- Jeong, S. W., Lee, S. M., Yum, S. S., Iguchi, T., y Seo, Y. R. (2013). Genomic expression responses toward bisphenol-A toxicity in *Daphnia magna* in terms of reproductive activity. *Mol Cel Toxicol*, 9(2), 149–158. doi: <https://doi.org/gf5j>
- Kato, Y., Kobayashi, K., Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H., y Iguchi, T. (2010). Sequence divergence and expression of a transformer gene in the branchiopod crustacean, *Daphnia magna*. *Genomics*, 95(3), 160–165. doi: <https://doi.org/ftcj6f>
- Kim, H., Kim, J.-S., y Lee, Y.-M. (2017). Changes in activity and transcription of antioxidant enzymes and heat shock protein 90 in the water flea, *Daphnia magna* - exposed to mercury. *Toxicol Environ Health Sci*, 9(5), 300–308. doi: <https://doi.org/gc9x>
-

-
- Kinnberg, K., Holbech, H., Petersen, G. I., y Bjerregaard, P. (2007). Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 145(2), 165–170. doi: <https://doi.org/cx3sp3>
- Kretschmann, A., Gottardi, M., Dalhoff, K., y Cedergreen, N. (2015). The synergistic potential of the azole fungicides prochloraz and propiconazole toward a short α -cypermethrin pulse increases over time in *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol*, 162, 94–101. doi: <https://doi.org/f69vsv>
- Kuijper, B., y Hoyle, R. B. (2015). When to rely on maternal effects and when on phenotypic plasticity? *Evolution*, 69(4), 950–968. doi: <https://doi.org/f69k4g>
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Martinuzzi, C. S., Attademo, A. M., Bassó, A., y Colussi, C. L. (2019). Insecticide pyriproxyfen (Dragón®) damage biotransformation, thyroid hormones, heart rate, and swimming performance of *Odontophrynus americanus* tadpoles. *Chemosphere*, 220, 714–722. doi: <https://doi.org/gc9z>
- Lampert, W. (2011). *Daphnia: Development of a model organism in ecology and evolution* (O. Kinne, Ed.). Oldendorf/Luhe, Germany: International Ecology Unit. ISBN: 9783946729211
- Larsson, P., y Dodson, S. (1993). Invited Review Chemical communication in planktonic animals. *Arch Hydrobiol*, 129(2), 129–155. doi: <https://doi.org/gc92>
- Lawler, S. P. (2017). Environmental safety review of methoprene and bacterially-derived pesticides commonly used for sustained mosquito control. *Ecotox Environ Safe*, 139, 335–343. doi: <https://doi.org/f9z93j>
- LeBlanc, G. A., Mu, X., y Rider, C. V. (2000). Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the crustacean *Daphnia magna*. *Environ Health Persp*, 108(12), 1133–1138. doi: <https://doi.org/djpp9c>
-

-
- Li, Y., Ma, Y., Yang, L., Duan, S., Zhou, F., Chen, J., ... Zhang, B. (2020). Effects of azithromycin on feeding behavior and nutrition accumulation of *Daphnia magna* under the different exposure pathways. *Ecotox Environ Safe*, 197(110573), 110573. doi: <https://doi.org/gc93>
- Lima, E. P., Paiva, M. H. S., de Araújo, A. P., da Silva, E. V. G., da Silva, U. M., de Oliveira, L. N., ... de Melo Santos, M. A. V. (2011). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasit Vectors*, 4(1), 5. doi: <https://doi.org/crxnws>
- Liu, D., Liu, Y., Rao, J., Wang, G., Li, H., Ge, F., y Chen, C. (2013). Overexpression of the glutathione S-transferase gene from *Pyrus pyrifolia* fruit improves tolerance to abiotic stress in transgenic tobacco plants. *Mol Biol*, 47(4), 515–523. doi: <https://doi.org/gc95>
- Liu, Y., Han, W., Xu, Z., Fan, W., Peng, W., y Luo, S. (2018). Comparative toxicity of pristine graphene oxide and its carboxyl, imidazole or polyethylene glycol functionalized products to *Daphnia magna*: A two generation study. *Environ Pollut*, 237, 218–227. doi: <https://doi.org/gdh5fr>
- Liu, Z., Cai, M., Yu, P., Chen, M., Wu, D., Zhang, M., y Zhao, Y. (2018). Age-dependent survival, stress defense, and AMPK in *Daphnia pulex* after short-term exposure to a polystyrene nanoplastic. *Aquat Toxicol*, 204, 1–8. doi: <https://doi.org/gfmws5>
- Lotka, A. J. (1913). A natural population norm. *J Wash Acad Sci*. 3: 241-248, 289-293. doi: N/D
- Lubian, L. M. (1979). Factores que afectan al crecimiento en cultivo del alga planctónica marina *Nanochloris sp.* *Invest Pesq*, 67: 15. doi: N/D
- Lwetoijera, D., Harris, C., Kiware, S., Dongus, S., Devine, G. J., McCall, P. J., y Majambere, S. (2014). Effective autodissemination of pyriproxyfen to breeding
-

-
- sites by the exophilic malaria vector *Anopheles arabiensis* in semi-field settings in Tanzania. *Malar J*, 13(1), 161. doi: <https://doi.org/f545h2>
- Lynch, M., y Shapiro, J. (1981). Predation, enrichment, and phytoplankton community structure1: Phytoplankton community structure. *Limnol Oceanog*, 26(1), 86–102. doi: <https://doi.org/cbtmf5>
- Magi, E., y Di Carro, M. (2018). Marine environment pollution: The contribution of mass spectrometry to the study of seawater. *Mass Spectrom Rev*, 37(4), 492–512. doi: <https://doi.org/gc99>
- Maharajan, K., Muthulakshmi, S., Nataraj, B., Ramesh, M., y Kadirvelu, K. (2018). Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. *Aquat Toxicol*, 196, 132–145. doi: <https://doi.org/gc5z78>
- Maharajan, K., Muthulakshmi, S., Karthik, C., Nataraj, B., Nambirajan, K., Hemalatha, D., ... Ramesh, M. (2020). Pyriproxyfen induced impairment of reproductive endocrine homeostasis and gonadal histopathology in zebrafish (*Danio rerio*) by altered expression of hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis genes. *Sci Total Environ*, 735, 139496. doi: <https://doi.org/gdbb>
- Maoz, D., Ward, T., Samuel, M., Müller, P., Runge-Ranzinger, S., Toledo, J., ... Horstick, O. (2017). Community effectiveness of pyriproxyfen as a dengue vector control method: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(7), 1-20. doi: <https://doi.org/gbm73j>
- Mark, U., y Solbé, J. (1998). Analysis of the ecetoc aquatic toxicity (EAT) database V — The relevance of *Daphnia magna* as a representative test species. *Chemosphere*, 36(1), 155–166. doi: <https://doi.org/cz2vjn>
- Martin-Creuzburg, D., Wacker, A., y von Elert, E. (2005). Life history consequences of sterol availability in the aquatic keystone species *Daphnia*. *Oecologia*, 144(3), 362–372. doi: <https://doi.org/bdtg5g>
-

-
- Martins, A., y Guilhermino, L. (2018). Transgenerational effects and recovery of microplastics exposure in model populations of the freshwater cladoceran *Daphnia magna* Straus. *Sci Total Environ*, 631–632, 421–428. doi: <https://doi.org/gdbc>
- Marzo, M., Lavado, G. J., Como, F., Toropova, A. P., Toropov, A. A., Baderna, D., ... Benfenati, E. (2020). QSAR models for biocides: The example of the prediction of *Daphnia magna* acute toxicity. *SAR QSAR Environ Res*, 31(3), 227–243. doi: <https://doi.org/gjn6mp>
- Masiá, A., Campo, J., Navarro-Ortega, A., Barceló, D., y Picó, Y. (2015). Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data. *Sci Total Environ*, 503–504, 58–68. doi: <https://doi.org/gdbd>
- McGhee, K. E., Pintor, L. M., Suhr, E. L., y Bell, A. M. (2012). Maternal exposure to predation risk decreases offspring antipredator behaviour and survival in threespined stickleback. *Funct Ecol*, 26(4), 932–940. doi: <https://doi.org/f35b5p>
- McKee, D., y Ebert, D. (1996). The interactive effects of temperature, food level and maternal phenotype on offspring size in *Daphnia magna*. *Oecologia*, 107(2), 189–196. doi: <https://doi.org/b2b8jd>
- McKee, M. J., y Knowles, C. O. (1986). Effects of fenvalerate on biochemical parameters, survival, and reproduction of *Daphnia magna*. *Ecotox Environ Safe*, 12(1), 70–84. doi: <https://doi.org/bt5npm>
- Mikulski, A., Bernatowicz, P., Grzesiuk, M., Kloc, M., y Pijanowska, J. (2011). Differential levels of stress proteins (HSPs) in male and female *Daphnia magna* in response to thermal stress: a consequence of sex-related behavioral differences? *J Chem Ecol*, 37(7), 670–676. doi: <https://doi.org/c3d6ch>
-

-
- Monod, G., Rime, H., Bobe, J., y Jalabert, B. (2004). Agonistic effect of imidazole and triazole fungicides on in vitro oocyte maturation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar Environ Res*, 58(2–5), 143–146. doi: <https://doi.org/fqnm9>
- Moore, M. N., Depledge, M. H., Readman, J. W., y Paul Leonard, D. R. (2004). An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat Res*, 552(1–2), 247–268. doi: <https://doi.org/bfbp74>
- Moura, J. A. S., y Souza-Santos, L. P. (2020). Environmental risk assessment (ERA) of pyriproxyfen in non-target aquatic organisms. *Aquat Toxicol*, 222(105448), 105448. doi: <https://doi.org/gdbf>
- Muyssen, B. T., y Janssen, C. R. (2001). Multigeneration zinc acclimation and tolerance in *Daphnia magna*: implications for water-quality guidelines and ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem*, 20(9), 2053–2060. doi: <https://doi.org/bfcvmg>
- Naddy, R. B., Johnson, K. A., y Klaine, S. J. (2000). Response of *Daphnia magna* to pulsed exposures of chlorpyrifos. *Environ Toxicol Chem*, 19(2), 423–431. doi: <https://doi.org/dzfqbx>
- Nieto-Nafria, J. M.; Mier M. P. D (1985). *Tratado de entomología*. Eds. Omega S.A. Barcelona. ISBN: 9788428207485
- Nkoom, M., Lu, G., Liu, J., Dong, H., y Yang, H. (2019). Bioconcentration, behavioral, and biochemical effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac in *Daphnia magna*. *Environ Sci Pollut Res Int*, 26(6), 5704–5712. doi: <https://doi.org/gdbh>
- Nordberg, M., Templeton, D. M., Andersen, O., y Duffus, J. H. (2009). Glossary of terms used in ecotoxicology (IUPAC Recommendations 2009). *Pure Appl Chem*, 81(5), 829–970. doi: <https://doi.org/xfjnx>
-

-
- Núñez-Torrent, C. (2014). Lucha biológica contra la plaga de mosquitos en el cultivo del arroz en la provincia de Cádiz”. Dpto. Tcno. Asaja Jerez de la frontera, Cádiz. doi: N/D
- Oda, Y., Sato, K., Hanazato, T., Chang, K.-H., y Sakamoto, M. (2019). Enhanced sensitivity to an insecticide carbaryl in *Daphnia magna* mediated by fish kairomone. *Limnology*, 20(2), 137–141. doi: <https://doi.org/gdbj>
- Ohba, S.-Y., Ohashi, K., Pujiyati, E., Higa, Y., Kawada, H., Mito, N., y Takagi, M. (2013). The effect of pyriproxyfen as a “population growth regulator” against *Aedes albopictus* under semi-field conditions. *PloS One*, 8(7), e67045. doi: <https://doi.org/f48qcd>
- Olmstead, A. W., y LeBlanc, G. A. (2006). The environmental-endocrine basis of gynandromorphism (intersex) in a crustacean. *Int J Biol Sci*, 3(2), 77–84. doi: <https://doi.org/fzjmxq>
- Orchard, S. J., Holdway, D. A., Barata, C., y Van Dam, R. A. (2002). A rapid response toxicity test based on the feeding rate of the tropical cladoceran *Moinodaphnia macleayi*. *Ecotox Environ Safe*, 53(1), 12–19. doi: <https://doi.org/dcbz6x>
- Palma, P., Palma, V. L., Fernandes, R. M., Bohn, A., Soares, A. M. V. M., y Barbosa, I. R. (2009). Embryo-toxic effects of environmental concentrations of chlorpyrifos on the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotox Environ Safe*, 72(6), 1714–1718. doi: <https://doi.org/c8nm42>
- Pauwels, K., Stoks, R., y de Meester, L. (2005). Coping with predator stress: interclonal differences in induction of heat-shock proteins in the water flea *Daphnia magna*. *J Evol Biol*, 18(4), 867–872. doi: <https://doi.org/brtrr2>
- Pirow, R., Bäumer, C., y Paul, R. J. (2001). Benefits of haemoglobin in the cladoceran crustacean *Daphnia magna*. *J Exp Biol*, 204(20), 3425–3441. doi: <https://doi.org/gdbr>
-

-
- Poulsen, R., De Fine Licht, H. H., Hansen, M., & Cedergreen, N. (2021). Grandmother's pesticide exposure revealed bi-generational effects in *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol*, 236, 105861. doi: <https://doi.org/gf5q>
- Rabus, M., y Laforsch, C. (2011). Growing large and bulky in the presence of the enemy: *Daphnia magna* gradually switches the mode of inducible morphological defences. *Funct Ecol*, 25(5), 1137–1143. doi: <https://doi.org/dj9tb5>
- Raby, M., Zhao, X., Hao, C., Poirier, D. G., y Sibley, P. K. (2018). Relative chronic sensitivity of neonicotinoid insecticides to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*. *Ecotox Environ Safe*, 163, 238–244. doi: <https://doi.org/gdbt>
- Racke, K. D. (2003). Release of pesticides into the environment and initial concentrations in soil, water, and plants. *Pure Appl Chem*, 75(11–12), 1905–1916. doi: <https://doi.org/cq3g28>
- Reynaldi, S., Duquesne, S., Jung, K., y Liess, M. (2006). Linking feeding activity and maturation of *Daphnia magna* following short-term exposure to fenvalerate. *Environ Toxicol Chem*, 25(7), 1826–1830. doi: <https://doi.org/bf2q9p>
- Rhee, J.S., Raisuddin, S., Lee, K.W., Seo, J. S., Ki, J.S., Kim, I.C., ... Lee, J.S. (2009). Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* to environmental toxicants. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol*, 149(1), 104–112. doi: <https://doi.org/btk7r3>
- Rider, C. V., Gorr, T. A., Olmstead, A. W., Wasilak, B. A., y LeBlanc, G. A. (2005). Stress signaling: coregulation of hemoglobin and male sex determination through a terpenoid signaling pathway in a crustacean. *J Exp Biol*, 208(1), 15–23. doi: <https://doi.org/fj5chj>
- Rodrigues, A. C. M., Gravato, C., Quintaneiro, C., Bordalo, M. D., Golovko, O., Žlábek, V., ... Pestana, J. L. T. (2017). Exposure to chlorantraniliprole affects
-

-
- the energy metabolism of the caddisfly *Sericostoma vittatum*. *Environ Toxicol Chem*, 36(6), 1584–1591. doi: <https://doi.org/f9kd3h>
- Rodríguez-Menéndez, S., García, M., Fernández, B., Álvarez, L., Fernández-Vega-Cueto, A., Coca-Prados, M., ... González-Iglesias, H. (2018). The zinc-metallothionein redox system reduces oxidative stress in retinal pigment epithelial cells. *Nutrients*, 10(12), 1874. doi: <https://doi.org/gdbz>
- Rösch, A., Anliker, S., y Hollender, J. (2016). How biotransformation influences toxicokinetics of azole fungicides in the aquatic invertebrate *Gammarus pulex*. *Environ Sci Technol*, 50(13), 7175–7188. doi: <https://doi.org/f8vtb9>
- Rosic, N., Bradbury, J., Lee, M., Baltrotsky, K., y Grace, S. (2020). The impact of pesticides on local waterways: A scoping review and method for identifying pesticides in local usage. *Environ Sci Policy*, 106, 12–21. doi: <https://doi.org/gdb2>
- Rossaro, B., y Cortesi, P. (2013). The effects of tricyclazole treatment on aquatic macroinvertebrates in the field and in laboratory. *J Entomol Acarol Res*, 45(3), 128–136. doi: <https://doi.org/gd86>
- Ruppert, E. E. y Barnes, R. D. (1996). *Zoología de los invertebrados*. 6ª Edición. Eds. Mc Graw-Hill Interamericana. S.A. México. ISBN: N/D
- Saltzmann, K. A., Saltzmann, K. D., Neal, J. J., Scharf, M. E., y Bennett, G. W. (2006). Effects of the juvenile hormone analog pyriproxyfen on German cockroach, *Blattella germanica* (L.), tergal gland development and production of tergal gland secretion proteins. *Arch Insect Biochem Physiol*, 63(1), 15–23. doi: <https://doi.org/fv4jfc>
- Sancho, E., Villarroel, M. J., Andreu, E., y Ferrando, M. D. (2009). Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole. *Chemosphere*, 74(9), 1171–1178. doi: <https://doi.org/cv55pj>
-

-
- Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. W. A., y van den Berg, M. (2002). Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 182(1), 44–54. doi: <https://doi.org/b65zsg>
- Sanz, F. (1974). Sentido y posibilidades de la toxicología ambiental. Discurso de apertura del curso académico 1974-1975. U.C.M.
- Sato, M., Kawakami, T., Kondoh, M., Takiguchi, M., Kadota, Y., Himeno, S., y Suzuki, S. (2010). Development of high-fat-diet-induced obesity in female metallothionein-null mice. *FASEB*, 24(7), 2375–2384. doi: <https://doi.org/frvrqm>
- Seyoum, A., y Pradhan, A. (2019). Effect of phthalates on development, reproduction, fat metabolism and lifespan in *Daphnia magna*. *Sci Total Environ*, 654, 969–977. doi: <https://doi.org/gjd2sm>
- Seyoum, A., Pradhan, A., Jass, J., y Olsson, P.E. (2020). Perfluorinated alkyl substances impede growth, reproduction, lipid metabolism and lifespan in *Daphnia magna*. *Sci Total Environ*, 737, 139682. doi: <https://doi.org/gjd2sn>
- Siciliano, A., Russo, D., Spasiano, D., Marotta, R., Race, M., Fabbricino, M., ... Guida, M. (2019). Chronic toxicity of treated and untreated aqueous solutions containing imidazole-based ionic liquids and their oxydized by-products. *Ecotox Environ Safe*, 180, 466–472. doi: <https://doi.org/gdb4>
- Silva, A. R. R., Cardoso, D. N., Cruz, A., Pestana, J. L. T., Mendo, S., Soares, A. M. V. M., y Loureiro, S. (2017). Multigenerational effects of carbendazim in *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem*, 36(2), 383–394. doi: <https://doi.org/f9m3sv>
- Sitia, R., y Braakman, I. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature*, 426(6968), 891–894. doi: <https://doi.org/cmsr7w>
-

-
- Skaare, J. U., Bernhoft, A., Derocher, A., Gabrielsen, G. W., Goksøyr, A., Henriksen, E., ... Wiig. (2000). Organochlorines in top predators at Svalbard - occurrence, levels and effects. *Toxicol Lett*, 112–113, 103–109. doi: <https://doi.org/ch4zxz>
- Smirnov, N. N. (2017). *Physiology of the Cladocera*. Amsterdam: Academic Press. ISBN: 9780128052815
- Sobral, O., Chastinet, C., Nogueira, A., Soares, A. M., Gonçalves, F., y Ribeir, R. (2001). *In vitro* development of parthenogenetic eggs: a fast ecotoxicity test with *Daphnia magna*? *Ecotox Environ Safe*, 50(3), 174–179. doi: <https://doi.org/c2nf7c>
- Soetaert, A., Moens, L. N., Van der Ven, K., Van Leemput, K., Naudts, B., Blust, R., y De Coen, W. M. (2006). Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. *Comp Biochem Physiol Part C*, 142(1–2), 66–76. doi: <https://doi.org/bfvvgjn>
- Soetaert, A., van der Ven, K., Moens, L. N., Vandenbrouck, T., van Remortel, P., y De Coen, W. M. (2007). *Daphnia magna* and ecotoxicogenomics: gene expression profiles of the anti-ecdysteroidal fungicide fenarimol using energy-, molting- and life stage-related cDNA libraries. *Chemosphere*, 67(1), 60–71. doi: <https://doi.org/c7pj5d>
- Sokolova, I. M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., y Sukhotin, A. A. (2012). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar Environ Res*, 79, 1–15. doi: <https://doi.org/f34jmh>
- Stanneck, D., Larsen, K. S., y Mencke, N. (2002). An evaluation of the effects of pyriproxyfen on eggs and adults of the cat flea, *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Irish Vet J*, 55: 383-387. doi: N/D
-

-
- Steinberg, C. E. W., Stürzenbaum, S. R., y Menzel, R. (2008). Genes and environment - striking the fine balance between sophisticated biomonitoring and true functional environmental genomics. *Sci Total Environ*, 400(1–3), 142–161. doi: <https://doi.org/fvsxww>
- Stentiford, G. D., Chang, E. S., Chang, S. A., y Neil, D. M. (2001). Carbohydrate dynamics and the crustacean hyperglycemic hormone (CHH): effects of parasitic infection in Norway lobsters (*Nephrops norvegicus*). *Gen Comp Endocrinol*, 121(1), 13–22. doi: <https://doi.org/bn3qgs>
- Stjernman, M., y Little, T. J. (2011). Genetic variation for maternal effects on parasite susceptibility: Genetic variation for maternal effects. *J Evol Biol*, 24(11), 2357–2363. doi: <https://doi.org/bnxjt3>
- Sullivan, J. J., y Goh, K. S. (2008). Environmental fate and properties of pyriproxyfen. *J Pestic Sci*, 33(4), 339–350. doi: <https://doi.org/b6hv3j>
- Suman, D. S., Wang, Y., Faraji, A., Williams, G. M., Williges, E., y Gaugler, R. (2018). Seasonal field efficacy of pyriproxyfen autodissemination stations against container-inhabiting mosquito *Aedes albopictus* under different habitat conditions. *Pest Manag Sci*, 74(4), 885–895. doi: <https://doi.org/gdb6>
- Sun, C., y Zhang, S. (2015). Immune-relevant and antioxidant activities of vitellogenin and yolk proteins in fish. *Nutrients*, 7(10), 8818–8829. doi: <https://doi.org/f74p65>
- Sun, S., Fu, H., Zhu, J., Ge, X., Wu, X., Qiao, H., ... Zhang, W. (2018). Molecular cloning and expression analysis of lactate dehydrogenase from the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* in response to hypoxia. *Int J Mol Sci*, 19(7), 1990. doi: <https://doi.org/gd6ts3>
- Taylor, G., Baird, D. J., y Soares, A. M. V. M. (1998). Surface binding of contaminants by algae: Consequences for lethal toxicity and feeding to
-

-
- Daphnia magna* straus. Environ Toxicol Chem, 17(3), 412–419.
doi: <https://doi.org/cj98qm>
- Tessier, A. J., Henry, L. L., Goulden, C. E., y Durand, M. W. (1983). Starvation in *Daphnia*: Energy reserves and reproductive allocation1: Body mass and starvation. Limnol Oceanogr, 28(4), 667–676. doi: <https://doi.org/fwfr42>
- Thorp, J. H., Covich, A. P. (1991). Cladocera and other Branchiopoda. Ecology and classification of northamerican freshwater invertebrates. Academic Press Inc, U.S.A. ISBN: 978-0126906455
- Truong, L., Gonnerman, G., Simonich, M. T., y Tanguay, R. L. (2016). Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish. Environ Pollut, 218, 1089–1093. doi: <https://doi.org/ghb2dw>
- Tsunoda, T., Kawada, H., Huynh, T. T. T., Luu, L. L., Le, S. H., Tran, H. N., ... Takagi, M. (2013). Field trial on a novel control method for the dengue vector, *Aedes aegypti* by the systematic use of Olyset® Net and pyriproxyfen in Southern Vietnam. Parasites Vectors, 6(1), 6. doi: <https://doi.org/f44fsh>
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., y Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotox Environ Safe, 64(2), 178–189. doi: <https://doi.org/fwr3k4>
- van der Oost, R., Beyer, J., y Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ Toxicol Pharmacol, 13(2), 57–149. doi: <https://doi.org/fg9h22>
- van Leeuwen, C. J., Luttmer, W. J., y Griffioen, P. S. (1985). The use of cohorts and populations in chronic toxicity studies with *Daphnia magna*: A cadmium example. Ecotox Environ Safe, 9(1), 26–39. doi: <https://doi.org/bx3mck>
-

-
- Villarroel, M. J., Sancho, E., Andreu-Moliner, E., y Ferrando, M. D. (2009). Biochemical stress response in tetradifon exposed *Daphnia magna* and its relationship to individual growth and reproduction. *Sci Total Environ*, 407(21), 5537–5542. doi: <https://doi.org/drfmch>
- Vivas, M., Kemler, M., y Slippers, B. (2015). Maternal effects on tree phenotypes: considering the microbiome. *Trends Plant Sci*, 20(9), 541–544. doi: <https://doi.org/f7s24n>
- Völker, C., Boedicker, C., Daubenthaler, J., Oetken, M., y Oehlmann, J. (2013). Comparative toxicity assessment of nanosilver on three *Daphnia* species in acute, chronic and multi-generation experiments. *PloS One*, 8(10), e75026. doi: <https://doi.org/gdfj>
- Walthall, W. K., y Stark, J. D. (1997). A comparison of acute mortality and population growth rate as endpoints of toxicological effect. *Ecotox Environ Safe*, 37(1), 45–52. doi: <https://doi.org/bf87qk>
- Wang, C. Y., Teng, H. J., Lee, S. J., Lin, C., Wu, J. W., y Wu, H. S. (2013). Efficacy of various larvicides against *Aedes aegypti* immatures in the laboratory. *Jpn J Infect Dis*, 66(4), 341–344. doi: <https://doi.org/gdfk>
- Wang, K. S., Lu, C. Y., y Chang, S. H. (2011). Evaluation of acute toxicity and teratogenic effects of plant growth regulators by *Daphnia magna* embryo assay. *J Hazard Mater*, 190(1–3), 520–528. doi: <https://doi.org/b85qzb>
- Wang, S., Li, L., Yu, S., Dong, B., Gao, N., y Wang, X. (2021). A review of advances in EDCs and PhACs removal by nanofiltration: Mechanisms, impact factors and the influence of organic matter. *Chem Eng J*, 406(126722), 126722. doi: <https://doi.org/gdf7>
- Wang, Y., Wang, T., Ban, Y., Shen, C., Shen, Q., Chai, X., ... Wei, J. (2018). Di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure modulates antioxidant enzyme activity and
-

-
- gene expression in juvenile and adult *Daphnia magna*. Arch Environ Contam Toxicol, 75(1), 145–156. doi: <https://doi.org/gdqj2n>
- Watanabe, H., Oda, S., Abe, R., Tanaka, Y., y Tatarazako, N. (2018). Comparison of the effects of constant and pulsed exposure with equivalent time-weighted average concentrations of the juvenile hormone analog pyriproxyfen on the reproduction of *Daphnia magna*. Chemosphere, 195, 810–816. doi: <https://doi.org/gc2q29>
- Waterman, T. (1961). Comparative Physiology. The Physiology of Crustacea. Vol. 1. Academic Press, New York. ISBN: 9780323163323
- Weber, R. E., y Vinogradov, S. N. (2001). Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. Physiol Rev, 81(2), 569–628. doi: <https://doi.org/ggrngr>
- Weyers, A., Sokull-Klüttgen, B., Baraibar-Fentanes, J., y Vollmer, G. (2000). Acute toxicity data: A comprehensive comparison of results of fish, daphnia, and algae tests with new substances notified in the European Union. Environ Toxicol Chem, 19(7), 1931–1933. doi: <https://doi.org/cjx9mf>
- Wilson, A. J., Coltman, D. W., Pemberton, J. M., Overall, A. D. J., Byrne, K. A., y Kruuk, L. E. B. (2005). Maternal genetic effects set the potential for evolution in a free-living vertebrate population: Maternal genetic effects in Soay sheep. J Evol Biol, 18(2), 405–414. doi: <https://doi.org/dwsd7z>
- Wolf, J. B., Brodie, E. D., Iii, Cheverud, J. M., Moore, A. J., y Wade, M. J. (1998). Evolutionary consequences of indirect genetic effects. Trends Ecol Evol, 13(2), 64–69. doi: <https://doi.org/fqmmrs>
- Won, E.J., Hong, S., Ra, K., Kim, K.-T., y Shin, K.-H. (2011). Evaluation of the potential impact of polluted sediments using Manila clam *Ruditapes philippinarum*: bioaccumulation and biomarker responses. Environ Sci Pollut Res, 19(7), 2570–2580. doi: <https://doi.org/gdf8>
-

-
- Wu, R. S. S., y Lam, P. K. S. (1997). Glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase in the green-lipped mussel (*Perna viridis*): Possible biomarkers for hypoxia in the marine environment. *Water Res*, 31(11), 2797–2801. doi: <https://doi.org/ftxdpf>
- Wuerz, M., Whyard, S., Loadman, N. L., Wiegand, M. D., y Huebner, J. D. (2019). Sex determination and gene expression in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone. *J Plankton Res*, 41(4), 393–406. doi: <https://doi.org/ghfknj>
- Yu, P., Liu, Z., Wu, D., Chen, M., Lv, W., y Zhao, Y. (2018). Accumulation of polystyrene microplastics in juvenile *Eriocheir sinensis* and oxidative stress effects in the liver. *Aquat Toxicol*, 200, 28–36. doi: <https://doi.org/gdw496>
- Yuan, S., Li, H., Dang, Y., y Liu, C. (2018). Effects of triphenyl phosphate on growth, reproduction and transcription of genes of *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol*, 195, 58–66. doi: <https://doi.org/gc2pj9>
- Yúfera, M., Lubian, L. M., Pascual, E. (1983). Efecto de cuatro algas sobre el crecimiento poblacional de dos cepas de *Brachionus plicatilis* (Rotifera: Brachionidae) en cultivo. *Invest Pesq*, 47: 325–337. doi: <https://doi.org/crjgvd>
- Zaffagnini, F. (1987) Reproduction in *Daphnia*. In Peters, R. H. and De Bernardi, R. (eds), *Daphnia*. Vol. 45. *Memorie dell’Istituto Italiano di Idrobiologia*, Verbania Pallanza, pp. 245–284. ISBN: N/D
- Zalizniak, L., y Nugegoda, D. (2006). Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on three successive generations of *Daphnia carinata*. *Ecotox Environ Safe*, 64(2), 207–214. doi: <https://doi.org/cn9tbp>
- Zeis, B., Becher, B., Goldmann, T., Clark, R., Vollmer, E., Bölke, B., ... Paul, R. J. (2003). Differential haemoglobin gene expression in the crustacean *Daphnia magna* exposed to different oxygen partial pressures. *Biol Chem*, 384(8), 1133–1145. doi: <https://doi.org/fq77m7>
-

-
- Zheng, Y., Yuan, J., Gu, Z., Yang, G., Li, T., y Chen, J. (2020). Transcriptome alterations in female *Daphnia* (*Daphnia magna*) exposed to 17 β -estradiol. *Environ Pollut*, 261(114208), 114208. doi: <https://doi.org/gdgc>
- Zvinavashe, E., Du, T., Griff, T., van den Berg, H. H. J., Soffers, A. E. M. F., Vervoort, J., ... Rietjens, I. M. C. M. (2009). Quantitative structure-activity relationship modeling of the toxicity of organothiophosphate pesticides to *Daphnia magna* and *Cyprinus carpio*. *Chemosphere*, 75(11), 1531–1538. doi: <https://doi.org/d793hz>
- <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf> Banco nacional de ADN Carlos III. Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Universidad de Salamanca. Última vez consultado el 18/05/2021.
- <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2009-82202> Reglamento (CE) N° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de octubre de 2009 relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo. Última vez consultado 07/05/2021.
- <https://www.epa.gov/sites/production/files/2018-10/documents/quality-criteria-water-1976.pdf> U.S. EPA. (Environmental Protection Agency) (1983). Water quality criteria, 1972. National Academy of Sciences, U.S. E.P.A. Research Series. (Washington, D.C., U.S.A.). pp. 1-6. Última vez consultado 20/02/2021
- <https://www.iso.org/standard/54614.html> Organización Internacional de Normalización (2012). Water quality determination of the inhibition of the mobility to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, crustacea). ISO 6341: 1-10. Última vez consultado el 24/03/2021.
- https://www.mapa.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/pdf/Lista_Sustancias_activas_aceptadas_excluidas.pdf Reglamento (CE) N° 1107/2009. Anexo A. “Lista comunitaria de sustancias activas aprobadas, excluidas y en evaluación comunitaria, sustancias de bajo riesgo, sustancias candidatas a la
-

sustitución y lista de sustancias básicas”. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Última vez consultado 07/05/2021.

<http://www.marinespecies.org/aphia.php> WoRMS. Registro mundial de especies marinas. Última vez consultado 02/05/2021.

<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264069947-en.pdf?expires=1621963097&id=id&accname=guest&checksum=0AAA9A336705F9DA386ED60B3C297EA3> OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (2004). Test No. 202: *Daphnia sp.* Acute immobilisation Test and Reproduction Test, OECD Guidelines for testing Chemicals, Section 2. OECD Publishing, París (Francia). Última vez consultado 03/03/2021.

https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-211-daphnia-magna-reproduction-test_9789264185203-en OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (2012). Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, OECD guidelines for testing of chemicals, Section 2. OECD Publishing, París (Francia). Última vez consultado 14/04/2021.

https://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/guidelines/chemicals/pyriproxyfen-background.pdf OMS (Organización Mundial de la Salud). (2007). “Pyriproxyfen in drinking-water: Use for vector control in drinking-water sources and containers”. Última vez consultado 01/02/2021.

