



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, BIOLOGIA FUNCIONAL I
ANTROPOLOGIA FISICA

Programa de Doctorado en Contaminación, Toxicología y Sanidad Ambiental

**Análisis e Interpretación de las características ecofisiológicas de las poblaciones de
mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*) en los ríos Ebro y Mijares**

TESIS DOCTORAL DIRIGIDA POR:

Dra. Amparo Torreblanca Tamarit

Dra. Inmaculada Varó Vaello

Blanca Rodríguez Gamella

Burjassot, Valencia

Octubre 2022

Dra. Amparo Torreblanca Tamarit, Catedrática de Fisiología (Biología Funcional) de la Universitat de València y Dra. Inmaculada Varó Vaello, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones científicas

INFORMAN QUE:

Doña Blanca Rodríguez Gamella ha realizado bajo nuestra dirección, en el Departamento de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física de la Universitat de València, la Tesis Doctoral que lleva por título "**Análisis e Interpretación de las características ecofisiológicas de las poblaciones de mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*) en los ríos Ebro y Mijares.**"

Autorizamos su presentación para optar al Grado de Doctor por la Universitat de València, al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos.

Y para que así conste, firmamos la presente en Valencia, a 24 de septiembre 2022.



Dra. Amparo Torreblanca Tamarit.

Dra. Inmaculada Varó Vaello

Este estudio fue financiado mediante el proyecto “Estudio de la estructura genética y diferenciación ecológica de las poblaciones españolas del mejillón cebra frente a factores ambientales de origen natural y antropogénico. Bases científicas para su control ambiental sostenible (CEBRAPOP)” del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino con referencia RN2008-042-03.4 (2008-2009).

Los datos experimentales fueron obtenidos por Rocío Ureña y Olga Ruiz. Los análisis proteómicos se realizaron en el Centro de Investigación Príncipe Felipe y en el Servicio de Proteómica de la Universidad de Valencia. Con la asistencia técnica de Oreto Antúnez y Luz Valero.

“La ciencia es la progresiva aproximación del hombre al mundo real”

Max Planck

A mamá, allí donde estés, siempre
estás junto a mí.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mis directoras Amparo e Inma, la comprensión, paciencia y preocupación por el desarrollo de esta tesis doctoral, ya que me encuentro con graves problemas de salud derivados de mi enfermedad genética. Han sabido enseñarme el camino de la investigación, del buen hacer y del aprendizaje en esos momentos dónde las circunstancias no son cómo deseamos, nunca se pierde el tiempo en explorar y profundizar otros conceptos que no son exactamente lo que vamos buscando.

Gracias a todos los profesores con los que compartí la hora de comer en mis viajes a Valencia y a las compañeras con las que he coincidido en el cuarto de trabajo.
A papá por su ayuda y su felicidad al ver mis viajes para desarrollar esta tesis.
Por último y no por ello en menor importancia a mi buen marido, Carlos, sin él nunca se habría hecho esta tesis ...tanto que agradecer.

ABREVIATURAS MÁS USADAS

2D DIGE: Differential In Gel Electrophoresis

CAS1: Caspe puente

CAS2: Caspe lago

DDT: diclorofenil tricloroetano.

DWI: índice de contenido hídrico (del inglés dry weight index)

FAY: Fayón

FF. Flix Fábrica

FR: Flix Reserva

HCH: hexaclorociclohexano.

HSPs: proteínas de respuesta al estrés térmico.

I-TRAQ: Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation. Método de marcaje isobárico.

INTERPRO: Recurso que proporciona análisis funcional de proteínas clasificándolas en familias y prediciendo dominios y sitios importantes.

MALDI-TOF: desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a detector de iones.

MEQ: Embalse de Mequinenza

MS: Espectrometría de masas.

MT: metalotioneína

NCBI: National Center for Biotechnology Information. Centro Nacional para información biotecnológica de Estados Unidos.

PCBs: bifenilos policlorados.

PeCB: pentaclorobenceno.

PHA: hidrocarburos aromáticos policíclicos.

RR: Embalse de Riba-roja

SIT: Embalse de Sitjar

UNIPROT: Universal Protein. Principal recurso de alta calidad, completo y de libre acceso en el mundo de secuencias de proteínas e información funcional.

RESUMEN

El objetivo de la presente Tesis doctoral ha sido analizar e interpretar la información relativa a la ecofisiología de varias poblaciones españolas de mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*) en diferentes puntos del río Ebro y en el embalse de Sitjar del río Mijares recogidas en el año 2009 dentro del proyecto: "Estudio de la estructura genética y diferenciación ecológica de las poblaciones españolas del mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*) frente a factores ambientales de origen natural y antropogénico. Bases científicas para su control ambiental sostenible (CEBRAPOP)". Se han comparado los parámetros fisiológicos, bioquímicos y de expresión proteica de cada una de las poblaciones, así como los niveles de metales y metalotioneína.

En este estudio se seleccionaron siete poblaciones de mejillón cebra localizadas en diferentes puntos del río Ebro y una en el río Mijares, caracterizados por altos niveles de contaminación por metales de origen industrial. Se recogieron ejemplares de mejillón cebra en varias localizaciones del río Ebro próximas a la planta química, cuatro de ellas corriente arriba (Caspe puente y Caspe Lago, Fayón y Mequinenza) y tres situadas corriente abajo (Embalse de Flix, fábrica de Flix y Riba-roja). Por último, se incluyó el embalse de Sitjar en el río Mijares ya que en los informes de la Cuenca Hidrográfica del Júcar aparecía como zona afectada por la expansión de esta especie. Los animales fueron diseccionados en el punto de recogida, separando la concha del tejido blando (y en algunos casos almacenando la glándula digestiva y las branquias independientemente) para con posterioridad estudiar la acumulación de metales, así como para determinar los parámetros fisiológicos seleccionados y realizar el estudio proteómico.

Respecto a la acumulación de metales se encontró que las poblaciones situadas corriente arriba de Flix (Caspe, Mequinenza y Fayón) presentaban niveles de metales tóxicos bajos en la glándula digestiva, que en el caso del cadmio (Cd) estaban entre 0,12 y 0,30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y en el caso del mercurio (Hg) entre 0,87 y 2,06 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Flix y las poblaciones situadas corriente abajo (Riba-roja y embalse de Flix) y próximas a la planta cloro-alcalina tenían elevados niveles de Cd de 0,98 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y de Hg (14,91 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Además, los parámetros indicativos de su estado osmorregulatorio (índice de contenido hídrico, DWI por sus siglas en inglés) eran inferiores a los de las poblaciones situadas corriente arriba. La población de Sitjar es la que presentaba un contenido mayor de plomo respecto de todas las poblaciones estudiadas, con un valor medio de 0,24 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en glándula digestiva. Se encontraron niveles de cobre (Cu) y Zinc (Zn) en los dos tejidos bastante uniformes entre todas las poblaciones de estudio en otoño siendo coherente con

la existencia de mecanismos de regulación para los metales esenciales. Sin embargo, el contenido de Cu en la glándula digestiva en primavera y el de Zn en ambos tejidos en otoño fue variable entre poblaciones.

Al igual que ocurre con el contenido en metales, el contenido de metalotioneína (MT) fue mayor en la glándula digestiva que en las branquias en todas las poblaciones. El contenido de MT en las branquias se correlacionó de forma negativa con el contenido de Cd y Hg. En la glándula digestiva los valores de concentración de MT presentaron una correlación positiva con el contenido de Cd y Hg, de forma que las poblaciones situadas corriente abajo de Flix (con mayor cantidad de Hg y Cd) presentaron mayores valores de MT, posiblemente como consecuencia de la activación de mecanismos de defensa celular ante el estrés químico. En la población próxima a la Fábrica de Flix se alcanzaron valores de MT en glándula digestiva de 2439 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ mientras que en las localidades corriente arriba estos valores fueron cuatro veces inferiores. La actividad Na^+/K^+ -ATPasa en las branquias fue mayor y más variable entre poblaciones en primavera que en otoño.

El estudio proteómico realizado en las branquias de los mejillones mediante metodología DIGE permitió definir patrones de expresión proteica característico de cada población de estudiada y relacionarlo con factores ambientales incluyendo la contaminación por metales. Se detectaron 3626 proteínas, encontrándose diferencias significativas en su abundancia entre las diferentes poblaciones en 161 de ellas. A través del método de jerarquía de grupos se comprobó que las poblaciones de Fayón (río Ebro), cuyos tejidos presentan niveles elevados de metales esenciales Cu, Zn y de potasio (K), y la población de Sitjar (río Mijares), con altos valores de Pb en las branquias, presentaron un patrón de expresión similar entre ambas y bastante diferente al resto de las poblaciones. Por otra parte, las poblaciones de Caspe y Mequinenza, corriente arriba de Flix, donde la contaminación por Cd, Pb y Hg fue menor que en el resto de las poblaciones, mostraron un patrón de expresión de proteínas similar entre ellas. La población de Caspe Lago fue algo diferente de las otras dos. Los perfiles proteicos de las poblaciones de Flix Fábrica, Embalse de Flix y Riba-roja (todas ellas en el río Ebro), con valores más altos de metales tóxicos en sus tejidos que en el resto de las poblaciones, no permitieron una buena separación entre las poblaciones de las diferentes localidades al existir un solapamiento que dificulta diferenciarlas entre sí al no haber un predominio de proteínas con mayor o menor abundancia.

De las 35 proteínas seleccionadas por su expresión diferencial entre poblaciones se encontró que las funciones biológicas más relevantes fueron: procesos celulares (25%), respuesta a estímulos y metabolismo (14%), y por último regulación y el transporte (8%). Las

funciones moleculares más significativas fueron: actividad catalítica (37%), unión (24%) y actividad de un transportador (3%). Los componentes celulares principales fueron: citoplasma (22%), regiones anatómicas celulares (22%), membrana (14%) y orgánulo (8%). Estas 35 proteínas pueden agruparse en 4 clases: proteínas estructurales (ej. actina, espectrina, y tubulina), de respuesta al estrés térmico (ej.: HSP90, HSP83), de transporte iónico (ej. V-tipo protón ATPasa) y de metabolismo (ej. proteosoma, tiolasa).

En general, este estudio ha permitido diferenciar las poblaciones de mejillón cebrá en función de los valores de los contaminantes presentes en los tejidos específicos de los mejillones cebrá (glándula digestiva y branquias) así como de los niveles de MT y los cambios apreciados en el patrón de expresión proteica de cada localidad. También se ha podido relacionar el estado osmorregulatorio de estos organismos en función de las características de su hábitat natural, como la disponibilidad de nutrientes (fósforo), de metales esenciales (Cu y Zn) y de K. Aquellas poblaciones situadas en el curso alto del río Ebro con menor afectación por contaminantes y mayor cantidad de nutrientes son las que presentan individuos con mejor estado fisiológico. Sin embargo, las localidades próximas geográficamente al municipio de Flix (corriente abajo), ofrecen un hábitat más hostil, debiendo los mejillones cebrá adaptarse celular y bioquímicamente a la toxicidad de los metales pesados mediante defensas como la MT. Por otra parte, la población del embalse de Sitjar es un ejemplo de la adaptación de esta especie a factores abióticos desfavorables como es la presencia de plomo.

ABSTRACT

The aim of this doctoral thesis has been to analyze and interpret the information related to the ecophysiology of several Spanish populations of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in different locations of the Ebro River and in the Sitjar reservoir of the Mijares River collected in 2009 within the project: "Study of the genetic structure and ecological differentiation of Spanish populations of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) against environmental factors of natural and anthropogenic origin. Scientific bases for its sustainable environmental control (CEBRAPOP)". The physiological, biochemical and protein expression parameters, as well as metal and metallothionein levels of each of the selected populations were compared. In this study, seven populations of zebra mussels located in different points of the Ebro River and one in the Mijares river, characterized by high levels of contamination by metals of industrial origin, were selected. Zebra mussel specimens were collected in several locations of the Ebro River near the chemical plant, four of them upstream (Caspe bridge and Caspe Lago, Fayón and Mequinenza) and three downstream (Flix reservoir, Flix factory and Riba-roja). Finally, the Sitjar reservoir on the Mijares River was included since it appeared in the reports of the Júcar River Basin as an area affected by the expansion of this species. The animals were dissected at the collection point, separating the shell from the soft tissue (and in some cases storing the digestive gland and gills independently) to subsequently study the accumulation of metals, as well as to determine the selected physiological parameters and carry out the proteomic study.

Regarding the accumulation of metals, it was found that the populations located upstream of Flix (Caspe, Mequinenza and Fayón) presented low levels of toxic metals in the digestive gland, which in the case of cadmium (Cd) were between 0.12 and 0.30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and in the case of mercury (Hg) between 0.87 and 2.06 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Flix and the populations located downstream (Riba-roja and Flix reservoir) and close to the chlor-alkali plant had elevated levels of Cd (0.98 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and Hg (14.91 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). In addition, parameters indicative of their osmoregulatory status (water content index, DWI) were lower than those of upstream populations. The Sitjar population had the highest lead content of all the populations studied, with a mean value of 0.24 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in the digestive gland. Copper (Cu) and Zinc (Zn) levels in the two tissues were found to be fairly uniform among all study populations in autumn, consistent with the existence of regulatory mechanisms for essential metals. However, the content of Cu in the digestive gland in spring and that of Zn in both tissues in autumn was variable among populations.

As with metal content, metallothionein (MT) content was higher in the digestive gland than in the gills in all populations. MT content in the gills was negatively correlated with Cd and Hg content. In the digestive gland, MT concentration values presented a positive correlation with Cd and Hg content, so that populations downstream of Flix (with higher Hg and Cd) presented higher MT values, possibly as a consequence of the activation of cellular defense mechanisms against chemical stress. In the population near the Flix factory, MT values in the digestive gland reached 2439 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, while in the upstream localities these values were four times lower. Na^+/K^+ -ATPase activity in gills was higher and more variable among populations in spring than in autumn.

The proteomic study carried out on mussel gills using DIGE methodology allowed us to define protein expression patterns characteristic of each population studied and to relate them to environmental factors including metal contamination. A total of 3626 proteins were detected, finding significant differences in their abundance among the different populations in 161 of them. Using the hierarchy method, it was found that the populations of Fayón (Ebro River), whose tissues present high levels of essential metals Cu, Zn and potassium (K), and the population of Sitjar (Mijares River), with high values of Pb in the gills, presented a similar expression pattern between them and quite different from the rest of the populations. On the other hand, the Caspe and Mequinenza populations, upstream of Flix, where Cd, Pb and Hg contamination was lower than in the rest of the populations, showed a similar protein expression pattern between them. The Caspe Lago population was somewhat different from the other two. The protein profiles of the populations of Flix Fábrica, Embalse de Flix and Riba-roja (all of them in the Ebro river), with higher values of toxic metals in their tissues than in the rest of the populations, did not allow a good separation between the populations of the different localities as there was an overlap that made it difficult to differentiate them from each other as there was no predominance of proteins with higher or lower abundance.

Among the 35 proteins selected for their differential expression between populations, it was found that the most relevant biological functions were: cellular processes (25%), response to stimuli and metabolism (14%), and finally regulation and transport (8%). The most significant molecular functions were: catalytic activity (37%), binding (24%) and transporter activity (3%). The main cellular components were: cytoplasm (22%), cellular anatomical regions (22%), membrane (14%) and organelle (8%). These 35 proteins can be grouped into 4 classes: structural proteins (e.g. actin, spectrin, and tubulin), heat stress response proteins (e.g. HSP90, HSP83), ion transport proteins (e.g. V-type proton ATPase) and metabolism proteins (e.g. proteasome, thiolase).

In general, this study has allowed us to differentiate the zebra mussel populations according to the values of contaminants present in the specific tissues selected (digestive gland and gills), as well as the levels of MT and the changes seen in the pattern of protein expression in each locality. It has also been possible to relate the osmoregulatory status of these organisms to the characteristics of their natural habitat, such as the availability of nutrients (phosphorus), essential metals (Cu and Zn) and K. Those populations located in the upper reaches of the Ebro River with a lower affectation by pollutants and a higher amount of nutrients are those with individuals with a better physiological status. However, the localities geographically close to the municipality of Flix (downstream), offer a more hostile habitat, and the zebra mussels must adapt cellularly and biochemically to the toxicity of heavy metals by means of defences such as MT. On the other hand, the population of the Sitjar reservoir is an example of the adaptation of this species to unfavourable abiotic factors such as the presence of lead.

RESUM

L'objectiu de la present Tesi doctoral ha sigut analitzar i interpretar la informació relativa a la ecofisiologia de diverses poblacions espanyoles de clòtxina zebra (*Dreissena polymorpha*) en diferents punts del riu Ebre i en l'embassament de Sitjar del riu Millars recollides l'any 2009 dins del projecte: "Estudi de l'estructura genètica i diferenciació ecològica de les poblacions espanyoles de la clòtxina zebra (*Dreissena polymorpha*) enfront de factors ambientals d'origen natural i antropogènic. Bases científiques per al seu control ambiental sostenible (CEBRAPOP)". S'han comparat els paràmetres fisiològics, bioquímics i d'expressió proteica de cadascuna de les poblacions, així com els nivells de metalls i metal·lotioneïna.

En aquest estudi es van seleccionar set poblacions de clòtxina zebra localitzades en diferents punts del riu Ebre i una en riu Millars, caracteritzats per alts nivells de contaminació per metalls d'origen industrial. Es van recollir exemplars de clòtxina zebra en diverses localitzacions del riu Ebre pròximes a la planta química, quatre d'elles corrent a dalt (Casp pont i Casp Llac, Fayón i Mequinenza) i tres situades corrent a baix (Embassament de Flix, fàbrica de Flix i Riba-roja). Finalment, es va incloure l'embassament de Sitjar en el riu Millars ja que en els informes de la Conca Hidrogràfica del Xúquer apareixia com a zona afectada per l'expansió d'aquesta espècie. Els animals van ser dissecats en el punt de recollida, separant la petxina del teixit bla (i en alguns casos emmagatzemant la glàndula digestiva i les brànquies independentment) envers posteriorment estudiar l'acumulació de metalls, així com per a determinar els paràmetres fisiològics seleccionats i realitzar l'estudi proteòmic.

Respecte a l'acumulació de metalls es va trobar que les poblacions situades corrent a dalt de Flix (Casp, Mequinenza i Fayón) presentaven nivells de metalls tòxics baixos en la glàndula digestiva, que en el cas del cadmi (Cd) estaven entre 0,12 i 0,30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ i en el cas del mercuri (Hg) entre 0,87 i 2,06 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Flix i les poblacions situades corrent a baix (Riba-roja i embassament de Flix) i pròximes a la planta clor-alcalina tenien elevats nivells de Cd (0,98 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) i de Hg (14,91 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). A més, els paràmetres indicatius del seu estat osmorregulatori (índex de contingut hídic, DWI per les seues sigles en anglés) eren inferiors als de les poblacions situades corrent a dalt. La població de Sitjar és la que presentava un contingut major de plom respecte de totes les poblacions estudiades, amb un valor mitjà de 0,24 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en glàndula digestiva. Es van trobar nivells de coure (Cu) i Zinc (Zn) en els dos teixits bastant uniformes entre totes les poblacions d'estudi a la tardor sent coherent amb l'existència de mecanismes de regulació per als metalls essencials. No obstant això, el contingut de Cu en la glàndula digestiva a la primavera i el de Zn en tots dos teixits a la tardor va ser variable entre poblacions.

Igual que ocorre amb el contingut en metalls, el contingut de metal·lotioneïna (MT) va ser major en la glàndula digestiva que en les brànquies en totes les poblacions. El contingut de MT en les brànquies es va correlacionar de manera negativa amb el contingut de Cd i Hg. En la glàndula digestiva els valors de concentració de MT van presentar una correlació positiva amb el contingut de Cd i Hg, de manera que les poblacions amb major quantitat de Hg i Cd van presentar majors valors de MT, possiblement a conseqüència de l'activació de mecanismes de defensa cel·lular davant l'estrès químic. En la població pròxima a la Fàbrica de Flix es van aconseguir valors de MT en glàndula digestiva de $2439 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, mentre que en les localitats corrent a dalt aquests valors van ser quatre vegades inferiors. L'activitat Na^+/K^+ -ATPasa en les brànquies va ser major i més variable entre poblacions a la primavera que a la tardor.

L'estudi proteòmic realitzat en les brànquies de les clòtxines mitjançant metodologia *DIGE va permetre definir patrons d'expressió proteica característic de cada població d'estudiada i relacionar-lo amb factors ambientals incloent la contaminació per metalls. Es van detectar 3626 proteïnes, trobant-se diferències significatives en la seua abundància entre les diferents poblacions en 161 d'elles. A través del mètode de jerarquia de grups es va comprovar que les poblacions de Fayón (riu Ebre), els teixits del qual presenten nivells elevats de metalls essencials Cu, Zn i de potassi (K), i la població de Sitjar (riu Millars), amb alts valors de Pb en les brànquies, van presentar un patró d'expressió similar entre totes dues i bastant diferent a la resta de les poblacions. D'altra banda, les poblacions de Casp i Mequinenza, corrent a dalt de Flix, on la contaminació per Cd, Pb i Hg va ser menor que en la resta de les poblacions, van mostrar un patró d'expressió de proteïnes similar entre elles. La població de Casp Llac va ser una cosa diferent de les altres dues. Els perfils proteics de les poblacions de Flix Fàbrica, Embassament de Flix i Riba-roja (totes elles en el riu Ebre), amb valors més alts de metalls tòxics en els seus teixits que en la resta de les poblacions, no van permetre una bona separació entre les poblacions de les diferents localitats en existir un solapament que dificulta diferenciar-les entre si al no haver-hi un predomini de proteïnes amb major o menor abundància.

De les 35 proteïnes seleccionades per la seua expressió diferencial entre poblacions es va trobar que les funcions biològiques més rellevants van ser: processos cel·lulars (25%), resposta a estímuls i metabolisme (14%), i finalment regulació i el transport (8%). Les funcions moleculars més significatives van ser: activitat catalítica (37%), unió (24%) i activitat d'un transportador (3%). Els components cel·lulars principals van ser: citoplasma (22%), regions anatòmiques cel·lulars (22%), membrana (14%) i orgànul (8%). Aquestes 35 proteïnes poden agrupar-se en 4 classes: proteïnes estructurals (ex. actina, espectrina, i tubulina), de resposta a

l'estrés tèrmic (ex.: HSP90, HSP83), de transport iònic (ex. V-tipus protó ATPasa) i de metabolisme (ex. proteosoma, tiolasa).

En general, aquest estudi ha permès diferenciar les poblacions de clòtxina zebra en funció dels valors dels contaminants presents en els teixits específics analitzats (glàndula digestiva i brànquies) així com dels nivells de *MT i els canvis ~~benvolguts~~ en el patró d'expressió proteica de cada localitat. També s'ha pogut relacionar l'estat osmorregulatori d'aquests organismes en funció de les característiques del seu hàbitat natural, com la disponibilitat de nutrients (fòsfor), de metalls essencials (Cu i Zn) i de K. Aquelles poblacions situades en el curs alt del riu Ebre amb menor afectació per contaminants i major quantitat de nutrients són les que presenten individus amb millor estat fisiològic. No obstant això, les localitats pròximes geogràficament al municipi de Flix (corrent a baix), ofereixen un hàbitat més hostil, devent les clòtxines zebra adaptar-se cel·lular i bioquímicament a la toxicitat dels metalls pesants mitjançant defenses com la MT. D'altra banda, la població de l'embassament de Sitjar és un exemple de l'adaptació d'aquesta espècie a factors abiòtics desfavorables com és la presència de plom.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación química y especies invasoras: dos amenazas para la salud ecológica de los ríos.....	21
1.2 El contexto europeo.....	21
1.3 El mejillón cebra como especie invasora. Características de la especie.....	22
1.4 Impacto ecológico y económico del mejillón cebra	26
1.5 Caracterización de las poblaciones españolas de mejillón cebra frente a estresores naturales y antropogénicos en los ríos Ebro y Mijares	28
1.6 Hipótesis y objetivo.....	31

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Selección de las poblaciones de mejillón cebra en los ríos Ebro y Mijares y características de las áreas de estudio.....	33
2.2 Recogida de muestras, transporte y almacenaje en el laboratorio.....	34
2.3 Análisis de estresores naturales y antropogénicos en los puntos de muestreo y biodisponibilidad.....	35
2.3.1 Análisis de metales, potasio y fósforo en los tejidos.....	35
2.4 Determinación respuestas fisiológicas y bioquímicas.....	35
2.4.1 Índice de Contenido hídrico (DWI).....	35
2.4.2 Determinación de la actividad Na^+/K^+ -ATPasa en branquia.....	36
2.4.3 Determinación de metalotioneína (MT) en branquia y glándula digestiva.....	36
2.5 Análisis de la expresión proteica en branquia.....	3
2.5.1 Separación y análisis de expresión proteica mediante electroforesis bidimensional 2D DIGE.	37
2.5.2 Identificación de proteínas de interés con espectrometría de masas (MS).....	39
2.5.3 Identificación de proteínas de interés mediante iTRAQ.....	40
2.6 Análisis estadístico de datos.....	41

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Efectos de estresores naturales y antropogénicos.....	44
3.1.1 Contenido de metales, potasio y fósforo en los tejidos.....	44
3.2. Respuestas fisiológicas y bioquímicas:	
3.2.1 Actividad Na^+/K^+ -ATPasa en branquia.....	63
3.2.2 Metalotioneína en glándula digestiva y branquia.....	64

3.3. Expresión proteica en branquia.....	67
4. CONCLUSIONES GENERALES.....	92
5. BIBLIOGRAFÍA.....	95

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación química y especies invasoras: dos amenazas para la salud ecológica de los ríos

La presencia de especies exóticas invasoras y la contaminación química son dos de los estresores que amenazan la biodiversidad de los ríos (Vörösmarty et al, 2010). El mejillón cebra *Dreissena polymorpha* es una de las especies invasoras cuya presencia en los cuerpos de agua dulce mundiales ha generado más preocupación en las últimas décadas por su impacto ecológico y por las pérdidas económicas que produce en las instalaciones que invade (Comisaría de Aguas, Informe de situación del mejillón cebra 2006, (www.CHE)). Se han realizado muchos estudios en relación con su biología y sus requerimientos ecológicos con el fin de poder aplicar la información en su control y potencial erradicación (Vanderbush et al., 2021). Por otra parte, existen muchas evidencias de que los ríos a escala mundial presentan importantes problemas debidos a la contaminación química (Vörösmarty et al, 2010).

1.2 El contexto europeo

La Directiva Marco Europea del Agua (DMA) es una legislación que nació como respuesta a la necesidad de unificar las actuaciones en materia de gestión de agua en la Unión Europea y uno de sus objetivos es proteger y mejorar los ecosistemas acuáticos. Cuencas de los ríos, Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental. En España la gestión medioambiental de las cuencas de los ríos, con especial atención a la preservación de los recursos y a la calidad del agua corresponde a las Confederaciones Hidrográficas.

Por otra parte, la Comisión europea (CE) ha diseñado la Estrategia de la Unión Europea (UE) en materia de biodiversidad para 2030, que consiste en un amplio y ambicioso plan a largo plazo para proteger la naturaleza y revertir la degradación de los ecosistemas. La acción 16 del Objetivo 5 de dicha estrategia pretende proporcionar un marco legal para luchar contra las especies ajenas invasoras. El mejillón cebra pertenece a un grupo de especies que son nativas en una parte de la Unión, aunque ajenas e invasoras en otra parte del territorio europeo, por lo que estas especies no cumple con los criterios para ser incluidas en el listado de especies ajenas invasoras de la UE. A pesar de ello la CE considera necesaria la acción coordinada en la lucha del mejillón cebra (y otras especies en la misma situación) para salvaguardar la biodiversidad europea.

1.3 El mejillón cebra como especie invasora. Características de la especie

El mejillón cebra (*D. polymorpha*, Pallas 1771) descubierto por primera vez en el Mar Caspio, es un molusco bivalvo perteneciente a la familia *Dreissenidae* que actualmente se puede encontrar en muchas partes del mundo como especie invasora (Centre for Agriculture and Bioscience International [CABI], 2022). Su capacidad de fijación al sustrato, su ciclo vital, sus requerimientos ecológicos, su alta tasa reproductiva y otras características biológicas de la especie son importantes para el establecimiento de las poblaciones (Vanderbush et al., 2021). Su ciclo de vida puede dividirse en dos grandes fases, la primera es planctónica, donde las larvas se mueven de forma libre en la masa de agua y la segunda es bentónica, en la cual el organismo ya se ha fijado a un sustrato (Figura 1). La protección proporcionada por la concha y la fijación a los sustratos mediante la estructura denominada biso son clave para el proceso de colonización. Al igual que en el resto de los moluscos bivalvos, la estructura responsable de la formación de la concha es el manto. Éste segrega pigmentos desde las células del margen distal hacia el perióstraco o capa externa de la concha confiriendo su aspecto característico de bandas clara y oscuras (Figura 2). Las células apicales segregan conquiolinas que son las responsables del crecimiento a lo largo de la vida del organismo de forma discontinua formando anillos de crecimiento. La capa prismática de la concha se forma por las células glandulares del extremo distal del manto que secretan carbonato cálcico en forma de prismas empaquetados siendo ésta la primera capa de protección para el animal. Los mejillones cebra se fijan al sustrato a través del biso, estructura constituida por un conjunto de filamentos córneos formados por las células de las glándulas del pie que segregan una sustancia pegajosa y fluida que al estar en contacto con el agua se solidifica quedando anclados de una forma permanente. En las etapas juveniles si las condiciones ambientales no son las idóneas pueden desplazarse en busca de mejores hábitats.

Otro aspecto importante de la biología del mejillón cebra (*D. polymorpha*) es la alimentación mediante filtración descrita en detalle por Baker et al. (2000). Las partículas suspendidas (algas unicelulares, zooplancton, bacterias y detritos orgánicos) que entran junto con el agua mediante el sifón inhalante a la cavidad paleal son clasificadas por las branquias y aquellas de ciertas características (tamaño principalmente) quedan retenidas, al ser englobadas por una sustancia generada en las células glandulares, y mediante los palpos labiales son llevadas a la boca. Las partículas que no pueden ser retenidas se expulsan mediante un sifón exhalante. De esta forma extraen de la masa de agua las partículas suspendidas necesarias para

la supervivencia pudiendo retener partículas de hasta $0,7\mu\text{m}$. Un mejillón cebra adulto puede filtrar entre 1-2,5 L de agua/día (Vanderbush et al., 2021).

Una cualidad importante de la fisiología del mejillón cebra es su comportamiento respecto la osmolaridad y la composición iónica del medio. Los mejillones cebra, al igual que el resto de los organismos dulceacuícolas, mantienen una concentración osmótica de su medio interno superior a la del agua dulce, es decir son organismos reguladores hiperosmóticos. Cuando se encuentran en medios con osmolaridades elevadas su supervivencia depende de la composición del medio, siendo la relación entre las concentraciones de los iones sodio y potasio de gran importancia. Además, el potasio juega un papel clave en el control del volumen celular cuando se encuentran en medios hiperosmóticos llegando a ser tóxico si se acumula en las células (Dietz et al, 1996; Wilcox y Dietz 1998).

Los hábitats más adecuados para el mejillón cebra son los embalses, los lagos y los ríos de agua dulce, cuya corriente no supere una velocidad de 1,5 m/s para que las larvas puedan fijarse al sustrato. Suelen encontrarse desde 2 m hasta 7 m de profundidad, pudiendo llegar hasta 14 m. La temperatura óptima de crecimiento y reproducción oscila entre 10 y 25°C, la concentración de O_2 disuelto debe ser $>10\%$ y la de Ca^{2+} $>10\text{mgL}^{-1}$. El pH debe estar en un rango de 7,4-8,5 para la correcta maduración de gónadas y liberación a medio externo de las células germinales (Araujo, www.chj.es acceso octubre 2022)

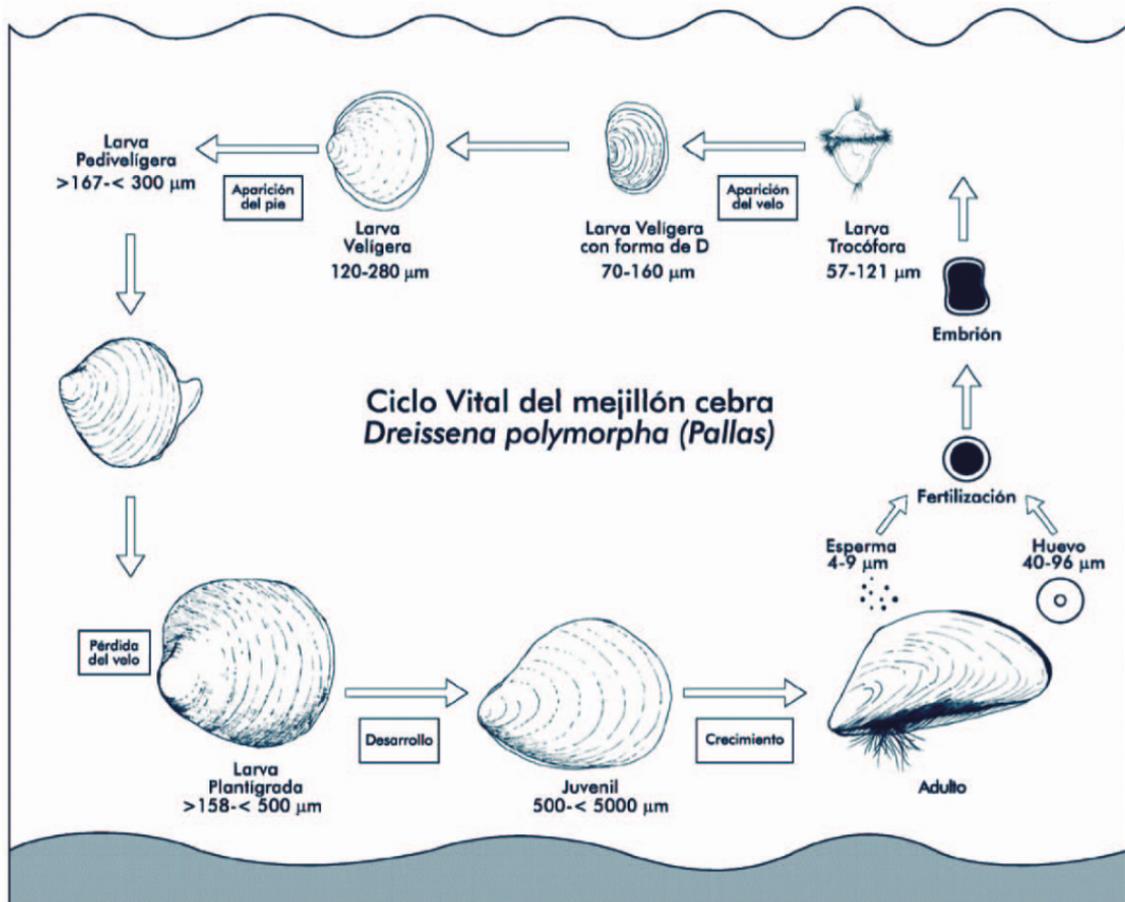


Figura 1. Ciclo larvario de *D. polymorpha*. CEAM, 2004



Figura 2. Mejillón cebra (*D. polymorpha*). www.cienciaybiología.com

Esta especie se introduce en Europa a través de las aguas lastradas procedentes de la navegación, la pesca, el comercio marítimo y las aves durante el último tercio del siglo XVIII pasando desde Rusia a Dinamarca, Alemania, Holanda, Inglaterra e Irlanda, y Estados Unidos (Josefsson and Andersson, 2001). En España es descubierto por primera vez en el año 2001 en el embalse de Ribarroja, en Aragón (Jiménez et al. 2001), extendiéndose desde ahí a los embalses de Flix (Tarragona), Mequinenza, Fayón, Caspe (Aragón) (Ruiz-Altaba 2001), (Figura 3). La Figura 4 muestra la distribución del mejillón cebra en todo el mundo.

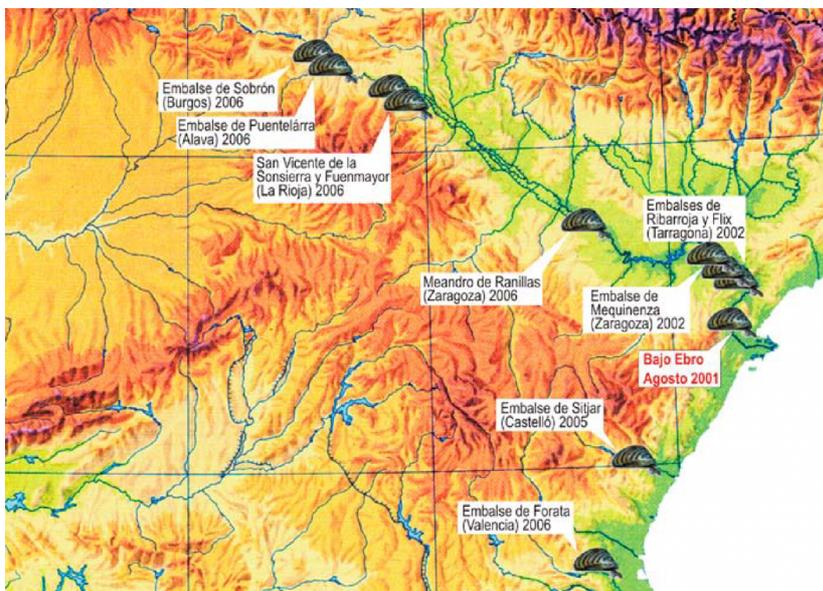


Figura 3. Expansión del mejillón cebra (*D. polymorpha*) desde 2001 hasta 2006 en la cuenca del río Ebro. www.ibdigital.uib.es

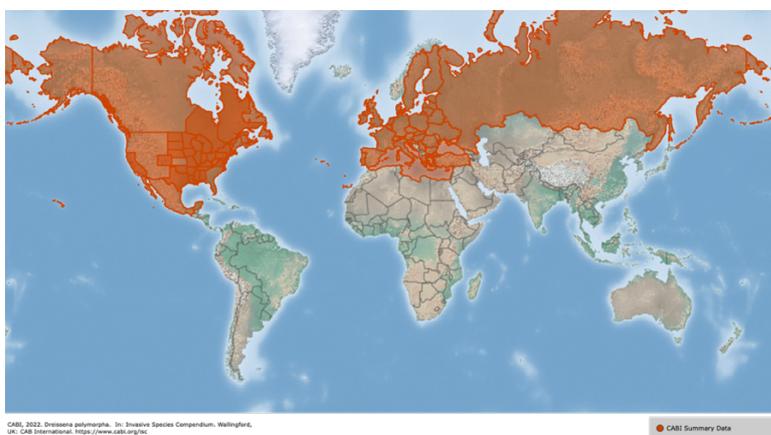


Figura 4. Distribución del mejillón cebra (*D. polymorpha*) en todo el mundo. www.cabi.org/ISC, 2022.

1.4 Impacto ecológico y económico del mejillón cebra

Debido a su gran capacidad de reproducción, expansión y colonización el mejillón cebra ha sido declarado como una de las 100 Especies Exóticas Invasoras más peligrosas del mundo por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN). Fue introducida en 2013 en el Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras Norma: Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto. Fecha: (BOE nº 185): 03.08.2013.

El problema ecológico que genera esta especie invasora deriva de la fijación de grandes poblaciones a sustratos duros de fondos naturales desplazando a especies autóctonas de interés ecológico y favoreciendo a otras especies oportunistas que suman su efecto al del mejillón cebra. Provoca cambios en el fitoplancton y en el zooplancton, producen un aclaramiento de las masas de agua superficiales. El mejillón cebra favorece el crecimiento de algas bentónicas y cambios en el seston y la materia orgánica en suspensión. Pueden modificar los ciclos biológicos de otras especies nativas al competir por el espacio y el alimento (Vanderbush et al., 2021).

A nivel económico el mejillón cebra produce grandes pérdidas económicas al obstruir las conducciones de agua sumergida, tomas hidráulicas, tuberías y canales de irrigación, acelerando la corrosión del acero en contacto con el agua de las tuberías por la acción de ferrobacterias y bacterias sulforreductoras. No hay que dejar de lado la adherencia de estos organismos a las embarcaciones lo que provoca un gran incremento en los costes de mantenimiento y limpieza de las mismas (Pimentel et al., 2000; Binimelis et al., 2007).

Entre las posibles soluciones para el control sostenible de esta especie se señalan: el avance en el conocimiento en cuánto a los puntos débiles de colonización, el seguimiento del control de larvas y la identificación de las zonas de riesgo. En cuanto al tratamiento químico, se recomiendan la utilización de métodos de cloración, de soluciones de bromo, de permanganato potásico, de hipoclorito sódico y de sulfato de aluminio. También son de ayuda los tratamientos biológicos como la exposición de pequeñas poblaciones de a altas densidades de un parásito específico y selectivo de mejillón cebra. En España se estima la valoración de daños producidos por mejillón cebra entre 2001-2005 en 40 millones de euros; y entre 2005-2009 11,6 millones en euros (Durán et al 2015)

Gracias a los planes de seguimiento de la calidad del agua de los programas LIFE + INVASEP (2012) en las cuencas hidrográficas de los ríos Tajo y Guadiana, LIFE+ RIPISILVANATURA (2014) en la cuenca del Segura y de descontaminación de embalses del mejillón cebra se determinó su presencia en la cuenca del río Ebro (2017) y en embalses de las

cuenca de la Confederación Hidrográfica del Júcar en 2018 y 2019 (Figuras 5 y 6, respectivamente). El último esfuerzo para el control sostenible del mejillón cebra ha sido el realizado por la Confederación Hidrográfica del Júcar con el “Plan de choque contra la invasión del mejillón cebra en 2017-2021” (www.chj.es), y el Proyecto de Plan Hidrológico de la demarcación hidrográfica del Ebro, revisión del tercer ciclo (2021-2027)”, convocada por MITECO-CHEbro, (www.chebro.es). Estas estrategias van dirigidas hacia la ampliación del conocimiento de esta especie, seguimiento de los métodos de control y erradicación existentes, revisión de las masas de agua según las indicaciones de la Estrategia Nacional, así como la revisión de embalses navegables donde ya existe un diseño de una red de estaciones de muestreo y vigilancia para larvas y animales adultos con los sistemas de aviso desarrollados.

Desde 2017 hasta 2021 se han realizado las actuaciones sobre navegación y gestión del dominio público hidráulico, elaborando y revisando los protocolos de desinfección desarrollados anteriormente.



Figura 5. Presencia o indicios de mejillón cebra (*D. polymorpha*) en los embalses de la cuenca del Ebro, mayo 2020. www.chebro.es

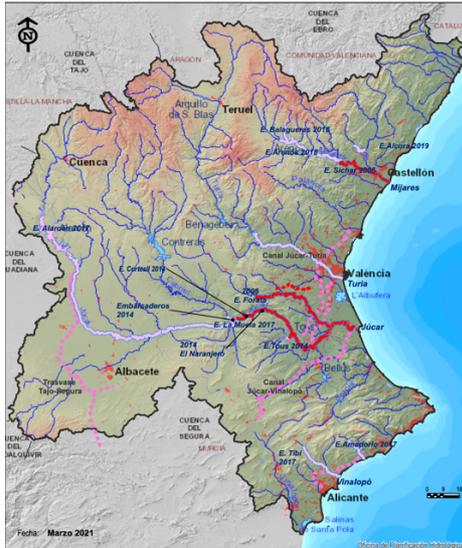


Figura 6. Presencia del mejillón cebra (*D. polymorpha*) en embalses de las cuencas de la Confederación Hidrográfica del Júcar. Marzo 2021. www.chj.es.

A pesar de los esfuerzos por un control sostenible y erradicación del mejillón cebra, según la Confederación Hidrográfica del Segura (13-062022) (<https://www.elagoradiario.com>), esta especie exótica invasora, está presente en 8 de las 15 demarcaciones hidrográficas de España, una de ellas en el embalse de Talave (Albacete). En este último caso se procedió a su erradicación mediante el vaciado del embalse para provocar la muerte de estos ejemplares adultos por desecación. La Figura 7 muestra ejemplares adultos de la especie en el embalse de Puenterallá (Álava)

Según el Ministerio para la Transición Ecológica el mejillón cebra también está presente en las demarcaciones del Guadalquivir, en las Cuencas Mediterráneas Andaluzas del Guadalete, Barbate, Tinto, Odiel y Piedras, además del Mijares, Ebro y del Distrito de Cuenca Fluvial de Cataluña. Sin embargo, aún no han sido atacadas por este invasor las Cuencas del Miño-Sil, Galicia-Costa, Cantábrico Occidental y Duero (<https://www.miteco.gob.es>).

1.5 Caracterización de las poblaciones españolas de mejillón cebra frente a estresores naturales y antropogénicos en los ríos Ebro y Mijares

Como se ha comentado en el apartado 1.3, el mejillón cebra entra en 2001 por primera vez en España en el Embalse de Riba-roja en el río Ebro, avanzando durante estos años y colonizando otras cuencas hidrográficas españolas. En las últimas décadas se ha realizado un gran esfuerzo para caracterizar las poblaciones de esta especie con el fin de comprender su virulencia y los mecanismos de los que dispone para adaptarse a ambientes que presentan

diferentes características bióticas y abióticas, destacando dentro de las últimas la contaminación química (Alix et al., 2016).

Debido a su forma de alimentación mediante filtración pueden acumular junto con el alimento trazas de contaminantes (Kwan et al, 2003). Su alta tasa de filtración, su amplia distribución geográfica y su fácil mantenimiento en el laboratorio ha propiciado que se haya utilizado profusamente en estudios ecotoxicológicos en relación con la toxicidad de metales, pesticidas y otras sustancias tóxicas presentes en las aguas convirtiéndose en una especie modelo en ecotoxicología (Connell et al., 1999; Pavin-Devin et al., 2014; Kerambrun et al., 2016) que se utiliza tanto en el laboratorio para conocer los mecanismos subyacentes a la toxicidad de los contaminantes como en estudios de biomonitorización en las aguas superficiales.



Figura 7. Capacidad del mejillón cebrá para afectar instalaciones. Embalse de Puentellará (Álava). www.CHE.

En el caso de las poblaciones de mejillón cebra de los ríos Ebro y Mijares se han realizado varios estudios tanto de laboratorio como de campo que se comentan y discuten con más detalle en la discusión de los resultados obtenidos de las diferentes partes de la Tesis. Detrás de muchos estudios está la convicción de que el conocimiento de la biología, y más en concreto de la ecofisiología, de las diferentes poblaciones puede contribuir a su control, de forma que es importante caracterizarlas a través de parámetros fisiológicos y bioquímicos (Navarro et al., 2013). Desde hace décadas el mejillón cebra ha sido utilizado para la biomonitorización de contaminantes de aguas dulces superficiales.

Con el fin de controlar la expansión del mejillón cebra de forma sostenible es importante dónde han producido un impacto económico y ecológico. Estudiando sus parámetros fisiológicos y bioquímicos, así como el cambio en el patrón de expresión proteica conseguiremos establecer diferencias ecofisiológicas entre poblaciones que permitan desarrollar e implementar métodos para controlar su expansión en los ecosistemas dulceacuícolas.

El conjunto de proteínas que expresa un organismo en un determinado momento bajo unas determinadas circunstancias se denomina proteoma (Wilkins et al., 1995), y éste cambia función de las características ambientales de cada ecosistema haciendo uso de los mecanismos fisiológicos que regulan la capacidad de adaptación y tolerancia de los organismos a diferentes ambientes.

Los mejillones cebra son organismos ormorreguladores y la principal limitación de un hábitat es el requerimiento iónico de K^+ (Wilcox y Dietz 1998), también es destacable el papel de las MTs que protegen al animal de estrés químico, así como la familia de proteínas protectoras frente al estrés térmico o HSP, (Snyder et al., 2001). El uso de técnicas “ómicas” (Torreblanca et al., 2003; Piña et al., 2007) permite conocer el estado de salud del animal y su capacidad de reaccionar frente al estrés medioambiental de forma que podamos diagnosticar el efecto fisiológico tanto de estresores naturales como antropogénicos (contaminantes metálicos, orgánicos, compuestos farmacéuticos, etc.) en las poblaciones de mejillón cebra.

La caracterización de las diferentes poblaciones de mejillón cebra en base a las diferencias bioquímicas y fisiológicas y el establecimiento de una relación con las condiciones ambientales permite ampliar el conocimiento sobre el mejillón cebra y contribuirá en el desarrollo de métodos biológicos para el control sostenible de esta especie invasora. Se disponía un gran volumen de datos obtenidos en el proyecto “Estudio de la estructura genética y diferenciación ecológica de las poblaciones españolas del mejillón cebra frente a factores ambientales de

origen natural y antropogénico. Bases científicas para su control ambiental sostenible (CEBRAPOP)” del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino con referencia RN2008-042-03.4, de dos años de duración (2008-2009), cuyo análisis detallado e interpretación a la luz de la información actual constituyen la presente Tesis Doctoral.

1.6 Hipótesis y objetivo

La hipótesis de trabajo es hay diferencias en las características fisiológicas y en la composición química de diferentes poblaciones de mejillón cebra (*D. polymorpha*) del rio Ebro y Mijares y que estas diferencias obedecen a factores naturales y antropogénicos de su hábitat.

Objetivo principal

El objetivo principal es la caracterización de las poblaciones de mejillón cebra en los ríos Ebro y Mijares en base a parámetros químicos, bioquímicos y fisiológicos y el establecimiento de las posibles relaciones con las particularidades de su hábitat con especial énfasis en la contaminación por metales.

Para conseguir el objetivo principal se han establecido los siguientes objetivos particulares:

1. Estudiar los aspectos relativos a la osmorregulación de las diferentes poblaciones.
2. Determinar el contenido de metales y la concentración de metalotioneína en los tejidos.
3. Comparar el patrón de expresión proteica y la abundancia de proteínas de estrés de las poblaciones.
4. Interpretar las diferencias encontradas en relación con las características del hábitat.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Selección de las poblaciones de mejillón cebra en los ríos Ebro y Mijares y características de las áreas de estudio

Para este estudio fueron seleccionadas siete poblaciones de mejillón cebra localizadas en diferentes puntos del río Ebro y una en el río Mijares (Figura 8). Las poblaciones seleccionadas fueron: dos poblaciones en el Embalse de Flix (F), cercano a la planta química cloro-alcalina, dónde se sitúan dos localidades: la primera en la orilla opuesta a la fábrica (FF), y la segunda próxima a la zona de desechos de la planta química (FR, Flix reserva). Dos poblaciones situadas a 5 y 17 Km del Embalse de Flix: Riba-roja (RB) y Fayón (FAY), respectivamente. Y tres poblaciones situadas corriente arriba: Mequinenza (MEQ) y Caspe puente (CAS1) y Caspe Lago (CAS 2). En el río Mijares, la población seleccionada fue la situada en la localidad de Sitjar (SIT).

La población de Riba-roja situada entre las regiones de Aragón y Cataluña, fue seleccionada por ser una de las primeras localizaciones afectadas por la colonización del mejillón cebra en España, en el caso de Flix (Tarragona), ha sido elegida por su alta contaminación industrial.

Las poblaciones de Fayón y Mequinenza situadas en la provincia de Zaragoza, próximas al meandro del río Ebro, han sido seleccionadas para estudiar la adaptabilidad de la especie en la confluencia de los ríos Segre, Ebro y Cinca; siendo Mequinenza una cuenca carbonífera, existiendo en la parte más oriental de la zona depósitos de lignito negro e industrias de cemento, químicas y azucareras, cuyas materias fueron transportados en otras épocas por el río hasta llegar a Fayón dónde existía una estación de ferrocarril que permitía su distribución.

En el caso del Embalse de Sitjar (provincia de Castellón) nos encontramos con una industria recicladora y una fábrica de azulejos. Los sedimentos del embalse están constituidos principalmente por minerales arcillosos como caolín, arcilla natural, barro, gres y feldespatos.



Figura 8. Selección de poblaciones naturales de mejillón cebrá (*D. polymorpha*) en las cuencas del Río Ebro y Río Mijares.

2.2 Recogida de muestras, transporte y almacenaje en el laboratorio

Dado que las poblaciones de mejillón cebrá presentan una marcada estacionalidad en su ciclo reproductor con un mayor crecimiento y reproducción durante la primavera-verano (Lowe and Pipe, 1987) ejemplares adultos, con un tamaño de concha entre 17-23 mm, se recolectaron a principios de la primavera (marzo 2009) y del otoño (octubre 2009). Un total 50 individuos fueron recogidos por localización (8 localidades en marzo y 7 en octubre de 2009, respectivamente) por un submarinista a una profundidad entre 3-5 m de la superficie del agua-

Los ejemplares se diseccionaron “in situ” y los tejidos (branquia y glándula digestiva) fueron inmediatamente depositados en nitrógeno líquido y transportados en hielo seco al laboratorio donde se almacenaron a -80°C.

2.3 Análisis de estresores naturales y antropogénicos en los puntos de muestreo y biodisponibilidad

2.3.1 Análisis de metales y fósforo en los tejidos.

Previamente se han homogeneizado los tejidos a analizar. Para el análisis de los elementos se digirieron los homogenizados en ácido nítrico concentrado a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente se calentaron las muestras a 80°C durante 2 horas. Dentro de cada serie de réplicas se usó un blanco con agua ultrapura sometido al mismo procedimiento que los homogenizados. La solución fue transferida a tubos limpios y diluida hasta un volumen final constante con agua ultrapura. Se analizaron las concentraciones de Cu, Zn, Mn, Fe, K, Ca, P, Cd, Pb and Hg utilizando la técnica de ICP-Masas con un modelo ELAN 6000 Perkin-Elmer. Las concentraciones de los elementos se expresan en toda la tesis como µg/g de peso fresco sino se indica lo contrario.

Los materiales de referencia (DOLT-3, LUTS-1, SRM1577c) se sometieron al mismo procedimiento de digestión y fueron analizados al mismo tiempo que los tejidos. El valor encontrado para todos los elementos es comparable al valor certificado, con un rango de recuperación del 85 al 110%.

2.4 Determinación de respuestas fisiológicas y bioquímicas

2.4.1 Índice de contenido hídrico

El índice de contenido hídrico (o índice de peso seco), abreviado por sus siglas del inglés “Dry Weight Index” como DWI, puede dar una estimación del estado de salud de algunos organismos y ha sido utilizado previamente en mejillón cebra (Binelli et al., 2001; Bacchetta y Mantecca, 2009). El DWI se ha estimado en un total de 10 individuos por localización y época de muestreo como la relación entre el peso seco y el peso húmedo de los tejidos blandos multiplicada por 100. Para obtener el índice una vez registrado el peso húmedo de cada tejido separado de la concha se procedió a su secado en estufa a 60°C durante 24 h, para determinar el peso seco.

2.4.2 Determinación de la actividad Na⁺/K⁺-ATPasa en branquia

La actividad de la enzima Na⁺/K⁺-ATPasa se determinó acorde con el procedimiento descrito por González-Mira et al (2018). Las muestras correspondientes a branquias de dos mejillones fueron pesadas en una balanza de precisión analítica previo a la determinación enzimática. El número de réplicas para cada localización fue n=5.

Las branquias (0,1 g de tejido) fueron homogeneizadas en un ultra-Turrax, en 1,5 mL de SEI buffer, compuesto por: 150 mM de sacarosa, 50 mM de imidazol y 10 mM de Na₂EDTA a pH 7,3. Una vez homogeneizadas las muestras, estas se centrifugaron a 5000 g durante 2 minutos a 4°C, y a continuación se separó el sobrenadante y se guardó a -80°C para su posterior análisis.

Para el ensayo en microplaca, se tomó una alícuota del sobrenadante (5 µL) al que se le añadió 100 µL de la siguiente solución: 0,1M de imidazol, 0,1 M NaCl, 0,02M KCl, 4 mM MgCl₂ * 6H₂O, 3 mM ATP-Na₂ libre de vanadio, ajustada a pH 7,4, a la que se adicionó 1mM de ouabaína, que es un inhibidor específico de Na⁺/K⁺-ATPasa.

Paralelamente, a una segunda alícuota de (5 µL) se le añadió una solución libre de ouabaína, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el párrafo anterior. A continuación, las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C, deteniéndose la reacción mediante la adición de 100 µL de ácido tricloroacético 10%.

La cantidad de fósforo libre se midió mediante la adición de 100 µL de solución de molibdato ácida (1.25 g dL⁻¹ de molibdato de amonio * 4H₂O en 2,5 N de H₂SO₄), y un preparado fresco de Fiske Subbarrow (Sigma). Se realizó una curva estándar de fósforo inorgánico (Pi) entre 0-400 µmol L⁻¹. Después de 30 minutos las absorbancias fueron medidas a una longitud de onda de 750 nm mediante un lector de placas TECAN (Salzburg, Austria).

La actividad enzimática de la Na⁺/K⁺-ATPasa fue determinada como la diferencia en el Pi producido por la reacción en ausencia y presencia ouabaína, inhibidor específico de la actividad Na⁺/K⁺-ATPasa. El contenido de proteína total fue determinado por el método de Bradford. La actividad de Na⁺/K⁺-ATPasa fue expresada en µmol de Pi mg proteína⁻¹ hora⁻¹.

2.4.3 Determinación de metalotioneína (MT) en branquia y glándula digestiva por polarografía de Pulso Diferencial (PPD)

Una muestra de glándula digestiva y branquia correspondiente a tres mejillones fue pesada y homogeneizada en hielo con una ultra-Turrax en tres volúmenes de 20 mM Tris-HCl buffer, 1 mM DTT y 0,2 mM PMSF a pH 8,6. Los homogeneizados fueron centrifugados a 30.000 g durante 45 minutos a 4°C, y el sobrenadante obtenido se transfirió a tubos limpios y

se calentó a 80°C durante 10 minutos, con el fin de desnaturalizar las proteínas. Posteriormente, se volvió a centrifugar a 30.000 g durante 45 minutos a 4°C, para precipitar las proteínas desnaturalizadas y se recuperó el sobrenadante que contiene en solución la MT que es termoestable.

La determinación de MT en el sobrenadante se realizó mediante el método PPD descrito por Bebianno (1989). Se añadió una alícuota del sobrenadante de 25 µL (glándula digestiva) o 50 µL (branquias) en la célula polarográfica que contenía 20 mL de electrolito soporte (cloruro de hexaminocobalto) junto con 250 µL de Triton X-100 a una concentración de 0,025%. La célula se purgó durante 2 min con N₂ purificado antes del análisis. Posteriormente se midió la respuesta polarográfica de la muestra durante un barrido de potencial de -1,38 V hasta -1,7 V mediante un analizador modelo Methrom 757 (VA Computrace, Methrom, Switzerland) en modo SMDE (electrodo de gotas de mercurio estacionario).

La cuantificación se realizó usando el método de adiciones estándar con MT I+II (Sigma), adicionando 250 µL de MT patrón con una concentración de 10 mg/L en agua destilada. Finalmente, se compararon las alturas de las curvas polarográficas de la muestra y las adiciones. Los resultados se expresaron como µg/g de peso fresco.

2.5 Análisis de la expresión proteica en branquia

2.5.1 Separación y análisis de expresión proteica mediante electroforesis bidimensional diferencial (2D DIGE, “Differential In Gel Electrophoresis”)

Preparación de muestras y marcaje con fluorescencia (CyDye (GE healthcare))

Las branquias se homogenizaron individualmente (n = 8) en un tampón Hepes-sacarosa (HEPES 10 mM; sacarosa 250 mM) que contenía DTT 1 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM e inhibidor de proteasa al 10 %, (cóctel Sigma-Aldrich P8340) ,durante 1 min en un baño de hielo, utilizando un homogeneizador ultraturax de 2400 rpm. A continuación, el homogenizado se centrifugó durante 1 h a 50.000 g a 4°C, se separó el sobrenadante resultante y se congeló a -80°C hasta su análisis.

La concentración de proteínas de los sobrenadantes se determinó mediante el ensayo de proteínas Bradford de Biorad (kit RcDc) con BSA (albúmina de suero bovino) como estándar. Previamente, las proteínas presentes en los sobrenadantes se precipitaron utilizando el kit de limpieza 2D (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) siguiendo las instrucciones del fabricante,

y se resuspendieron en tampón DIGE. El pH del extracto de proteínas se ajustó a 8,5 añadiendo 50 mM de NaOH.

Las proteínas de las branquias extraídas de cada población ($n = 4$) se marcaron al azar con Cy3 o Cy5. Para el marcaje mínimo DIGE, se mezclaron 50 μg de muestra de proteína con 400 pmol de Cy2, Cy3 o Cy5 CyDye (Cyanine Dye, Amersham Biosciences) mediante vórtex y se incubaron en hielo en la oscuridad durante 30 minutos. La reacción de marcaje se detuvo mediante la adición de 1 μL de 10 mM lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), seguido de una incubación en hielo durante otros 10 minutos. El de patrón interno se preparó con 25 μg de proteína de cada muestra de branquia, y mediante marcaje con Cy2 como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, se consideraron cuatro muestras por sitio (cada una con dos branquias agrupadas del mismo sitio)

Separación de proteínas por 2DE y adquisición de imágenes

Para la separación de las proteínas en la primera dimensión se utilizaron tiras de Immobiline® DryStrip pH 4–7, 24 cm (Company et al., 2011, 2012), que fueron rehidratadas pasivamente a 20°C durante 18h. Las muestras marcadas con Cy3 y Cy5 que se iban a separar en el mismo gel se juntaron con el estándar interno marcado con Cy2 y se mezclaron con un volumen igual de tampón de lisis 2x. A continuación, se usó una carga de copa anódica para cargar las muestras en la tira en la primera dimensión. El enfoque isoelectrico (IEF) se realizó aplicando 300 V durante 4 h, 600 V durante 3 h, 1000 V durante 3 h, 8000 V durante 3 h y 8000 V durante 32 000 Vh, utilizando una unidad Ettan™ IPGphor (GE Healthcare). Después, las tiras se equilibraron en tampón dodecilsulfato de sodio (SDS) (Tris-HCl 50 mM, urea 6 M, glicerol al 30 % (v/v), SDS al 2 % (p/v)), primero con ditioneitol al 1 % (DTT) (p/v) y, en segundo lugar, con yodoacetamida al 2,5%. Después del equilibrio, las tiras se cargaron en geles SDS-PAGE al 12,5 % en una unidad de separación Ettan Dalt-six (GE Healthcare), y se corrieron a 1 W/gel a 22 °C toda la noche (O/N). Todos los procedimientos de electroforesis se realizaron en la oscuridad.

Los geles se escanearon con un escáner láser Typhoon™ 9400 (GE Healthcare). Las longitudes de onda de excitación y emisión se eligieron específicamente para cada uno de los fluoróforos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

2.5.2 Identificación de proteínas de interés con espectrometría de masas (MS)

Las proteínas de interés se extrajeron manualmente de los geles analíticos y se procesaron digeridas con tripsina de grado de secuenciación (Promega), luego se sometieron a identificación por espectrometría de masas. La mezcla procesada se secó en una centrífuga de vacío, se resuspendió en 7 μL de ácido trifluoroacético al 0,1 % (TFA, Sigma) y se depositó 1 μL en la placa objetivo MALDI. Después de secar las gotas al aire a temperatura ambiente, 0.5 μL de matriz (5 mg mL⁻¹ de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA, Sigma) en 0.1% TFA-ACN/H₂O (1:1, v/ v)) se secó al aire a temperatura ambiente. Las fracciones resultantes se analizaron en un MALDI-TOF-TOF (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, EE. UU.) en modo de reflexión positiva (2000 disparos en cada posición). Cinco de los precursores más intensos (según los criterios de umbral: 1) mínima señal/ruido 10, 2) área mínima de racimo; 500, 3) espacio máximo de precursor: 200 ppm, 4) espacio máximo de fracción: se seleccionaron 4 para cada posición para el análisis MS/MS. Se adquirieron los datos de MS/MS correspondientes al control. Utilizando el método predeterminado MS/MS de 1 kV. La información de MS y MS/MS se envió a MASCOT a través del software GPS (Applied Biosystems). La búsqueda en la base de datos se realizó utilizando las bases de datos de Swiss-Prot, NCBI . Se utilizó la carbamidometilación de Cys como modificación fija y la oxidación de Met y la desamidación de Asn y Gln como modificaciones variables. Las secuencias candidatas se identificaron a partir de la base de datos sobre la base de masas peptídicas intactas, y los espectros completos o parciales que se esperaba que resultaran de la fragmentación de estos péptidos candidatos se generaron y compararon con el espectro experimental.

2.5.3 Identificación de proteínas de interés con método de marcaje isobárico (ITRAQ, “Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation”)

Se utilizaron los mismos sobrenadantes de branquias extraídos y en el mismo tampón que los experimentos de DIGE descritos en el apartado anterior. Por lo cual hubo que cambiarlas a otro medio. Se tomaron 30 μL de sobrenadante de una muestra por sitio de muestreo y se precipitó con TCA, y el precipitado se lavó con 30 μL de acetona fría. Tras secarlo al aire se disolvió en 50 μL de 50% TFE en 500 mM de TEAB. Se cuantificó la proteína presente en cada muestra mediante nanodrop, se tomó 110 μg para el marcaje y se diluyó hasta 20 μL con 50% TFE en 500 mM de TEAB. Posteriormente se redujeron las muestras con TCEP y a partir de este punto se siguieron las instrucciones descritas en el kit para iTRAQ (Applied Biosciences). Posteriormente se realizó un isoelectroenfoque en una tira de 7 cm de rango de pH 3-10 no lineal cargando 400 μg totales de péptidos. Al acabar el isoelectroenfoque se lavó la tira y se dividió en tiras de 0,5 cm. Se extrajeron los péptidos en diferentes soluciones, combinándose todas las de una misma fracción de tira. Tras evaporarlas y resuspenderlas en ACN 0,1% TFA se sometieron a análisis mediante HPLC en un equipo ETTAN LC (Amersham Biosciences) y posterior análisis mediante un espectrómetro cuadrupolo de tiempo de vuelo (QSTAR ESI XL Hybrid LC/MS/MS Mass Spectrometer System) siguiendo el protocolo descrito en Calderón-González et al (2015).

Los datos del algoritmo de búsqueda fueron:

PROTEIN PILOT v3.0 (ABI)

El software permite identificar las proteínas (Algoritmo de búsqueda PARAGON) y cuantificar las diferencias

Se analizan combinadas todas las fracciones.

ANALYSIS PARAMETERS

Sample Type: iTRAQ 8plex (Peptide Labeled)

Cys. Alkylation: MMTS

Digestion: Trypsin

Instrument: QSTAR ESI

Special Factors: Urea denaturation

Species:

ID Focus: Amino acid substitutions

Database: NCBI metazoa_20100312.fasta

Search Effort: Thorough

FDR Analysis: Yes

User Modified Parameter FYes

RESULT PARAMETERS

Detected Protein Threshold [Unused ProtScore (Conf)] >: 1.30 (95.0%)

Competitor Error Margin (ProtScore): 2

Software Version: ProteinPilot™ Software 3.0

Software Revision Number: 114732

Paragon™ Algorithm: 3.0.0.0, 113442

2.6 Análisis estadístico de datos

Los datos obtenidos en las determinaciones de metales en branquia y glándula digestiva, así como de actividad enzimática de Na⁺/K⁺-ATPasa en branquia y MT en branquia y glándula digestiva, se analizaron en primer lugar para comprobar si cumplían las premisas de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov), así como con la homogeneidad de las varianzas (prueba de Levene); por último, se realizó un análisis de correlación de Pearson con todas las variables analizadas. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software estadístico SPSS Systems (SPSS Inc., v15.0). El nivel de significación se estableció para todas las pruebas en $p < 0,05$. Para determinar las diferencias significativas dentro de cada grupo y entre todos los grupos para el factor población se aplicó el análisis estadístico ANOVA de una vía, seguido de la prueba *post hoc* de Tuckey para comparaciones múltiples.

El análisis estadístico de los geles 2D-DIGE para determinar la expresión diferencial de las proteínas se realizó utilizando DeCyder v6.5 Difference In-gel Analysis (DIA), Biological Variation Analysis (BVA) modules and Extended Data Analysis (EDA) v1.0 software (GE

Healthcare). Se empleó la prueba de ANOVA de una vía para determinar las proteínas diferencialmente expresadas en las poblaciones, seguida de una prueba *post hoc* test de Scheffé para las comparaciones múltiples. Por último, se utilizó el método jerárquico de agrupamiento de datos (hierarchical clustering) para construir una jerarquía de grupos

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Efectos de estresores naturales y antropogénicos

3.1.1 Contenido de metales, potasio y fósforo en los tejidos

Los valores obtenidos en las glándulas digestivas y las branquias en mejillón cebra para las concentraciones de metales Fe, Mn y Ca, para las de fósforo (P), así como para el índice de contenido hídrico (DWI) de los individuos, se presentan en las tablas 1 y 2. La concentración de metales en las poblaciones de estudio durante primavera y otoño de 2009 se expresan como valores medios normalizados por peso húmedo (también denominado peso fresco y abreviado como pf).

Tabla 1. Valores medios de concentración de metales y fósforo ($\mu\text{g/g}$) en glándula digestiva y branquia de *D. polymorpha* durante primavera en las poblaciones estudiadas. Las diferentes letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre poblaciones.

Elemento $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pf	PRIMAVERA									
		SIT	CAS1	RR	FF	MEQ	FR	CAS2	FAY	
P	Gl. Digestiva	^a 693,17 ± 134,40	^d 1292,48 ± 98,28	^{cd} 1160,21 ± 92,85	^{bc} 1007,11 ± 70,37	^{cd} 1099,28 ± 141,89	^{ab} 812,722 ± 132,81	^{abc} 935,61 ± 131,93	^{cd} 1165,41 ± 216,38	
	Branquia	^a 387,27 ± 72,01	^{ab} 458,62 ± 73,50	^b 510,46 ± 33,77	^b 418,01 ± 46,02	^{ab} 443,53 ± 49,62	^{ab} 578,97 ± 104,07	^a 439,78 ± 28,50	^c 673,91 ± 80,79	
Fe	Gl. Digestiva	^a 62,39 ± 11,18	^{ab} 85,774 ± 28,71	^b 88,33 ± 6,4	^b 147,89 ± 36,38	^{ab} 123,58 ± 44,2	^{ab} 77,22 ± 14,82	^a 53,72 ± 12,99	^c 48,405 ± 94,47	
	Branquia	^b 49,5 ± 15,46	^a 20,82 ± 8,46	^a 17,78 ± 6,85	^a 20,93 ± 4,45	^a 30,47 ± 4,57	^a 27,5 ± 15,01	^{ab} 34,13 ± 3,77	^a 25,11 ± 3,6	
Mn	Gl. Digestiva	^{ab} 3,21 ± 0,6	^{ab} 3,44 ± 0,54	^{ab} 4,54 ± 1,31	^{ab} 5,789 ± 1,48	^{ab} 3,67 ± 1,95	^a 3,86 ± 0,36	^{ab} 3,248 ± 0,4	^b 2,64 ± 14,05	
	Branquia	^a 1,72 ± 0,55	^a 1,421 ± 0,39	^a 1,65 ± 0,52	^a 1,93 ± 0,49	^a 1,886 ± 1,17	^a 1,84 ± 0,44	^a 1,38 ± 0,07	^a 1,87 ± 0,62	
Ca	Gl. Digestiva	^b 609,73 ± 83,28	^{ab} 516,59 ± 81,41	^{ab} 351,721 ± 102,46	^b 598,454 ± 222,64	^b 583,55 ± 65,71	^a 171,79 ± 1307,14	^b 654,02 ± 1020,8	^{ab} 411,329 ± 0,62	
	Branquia	^{abc} 353,161 ± 112,42	^{ab} 153,97 ± 38,05	^{ab} 179,53 ± 38,37	^{abc} 185,43 ± 50,4	^{abc} 243,392 ± 283,25	^{abc} 352,142 ± 181,27	^c 447,13 ± 108,3	^{abc} 245,67 ± 44,32	
DWI		^b 10,93 ± 1,69	^a 10,93 ± 2,1		^b 10,06 ± 1,09	^a 16,51 ± 0,8	^b 10,61 ± 0,91	^a 17,04 ± 0,58		

Tabla 2. Valores medios de concentración de metales y fósforo ($\mu\text{g/g}$) en glándula digestiva y branquia de *D. polymorpha* durante otoño en las poblaciones estudiadas. Las diferentes letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre poblaciones.

Elemento $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pf	OTOÑO								
		SIT	CAS1	RR	FF	MEQ	FR	CAS2	
P	Gl. Digestiva	a 521,32±30,07	bd 869,99±67,15	acd 619,89±121,82	c 684,79±47,09	c 654,26±37,23	abc 717,09±93,17	bd 842,04±52,56	
	Branquia	b 329,21±15,58	a 559,32±39,04	a 396,57±26,49	bcd 372,81±88,36	bcd 420,07±54,06	c 402,14±29,03	ad 509,95±19,11	
Fe	Gl. Digestiva	b 239,55±58,31	a 77,2±9,33	a 72,33±16,51	ac 93,79±13,39	b 193,7±18,76	ac 108,25±25,85	bc 122,81±13,81	
	Branquia	ab 68,8±21,82	a 51,05±10,92	a 31,96±9,98	ac 47,53±17,5	bc 97,63±17,42	a 36,2±9,5	b 161,38±43,87	
Mn	Gl. Digestiva	a 5,32±1,21	a 3,8±0,24	a 7,09±2,34	a 5,37±0,84	a 5,68±1,04	a 6,76±2,86	a 3,81±0,41	
	Branquia	a 1,39±0,44	a 2,11±0,53	a 3,17±1,36	a 2,57±1,16	a 1,9±0,43	a 2,65±1,44	a 1,51±0,3	
Ca	Gl. Digestiva	bc 1432,13±435,89	a 464,07±90,54	a 435,69±72,66	ab 564,97±142,43	c 1179,85±103,27	ab 519,5±104	abc 800,61±784,65	
	Branquia	b 513,77±99,48	ab 387,01±445,28	a 278,25±38,04	a 240,54±60,68	ab 414,08±109,65	a 332,32±73,98	ab 335,91±298,23	
DWI		c 7,71±0,01	a 13±0,01	c 6,06±0,01		b 8,1±0,02		b 8,88±0,02	

Metales tóxicos: cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (Pb)

Cadmio

Las concentraciones de Cd determinadas en la glándula digestiva y en las branquias de los individuos de las diferentes poblaciones se muestran en las Figuras (9 y 10). Se observa que los niveles de Cd son mayores en primavera en ambos tejidos, y que la población Flix Fábrica (FF) es la que presenta mayor nivel de Cd, existiendo diferencias significativas con el resto de las poblaciones en ambas estaciones de muestreo, primavera y otoño.

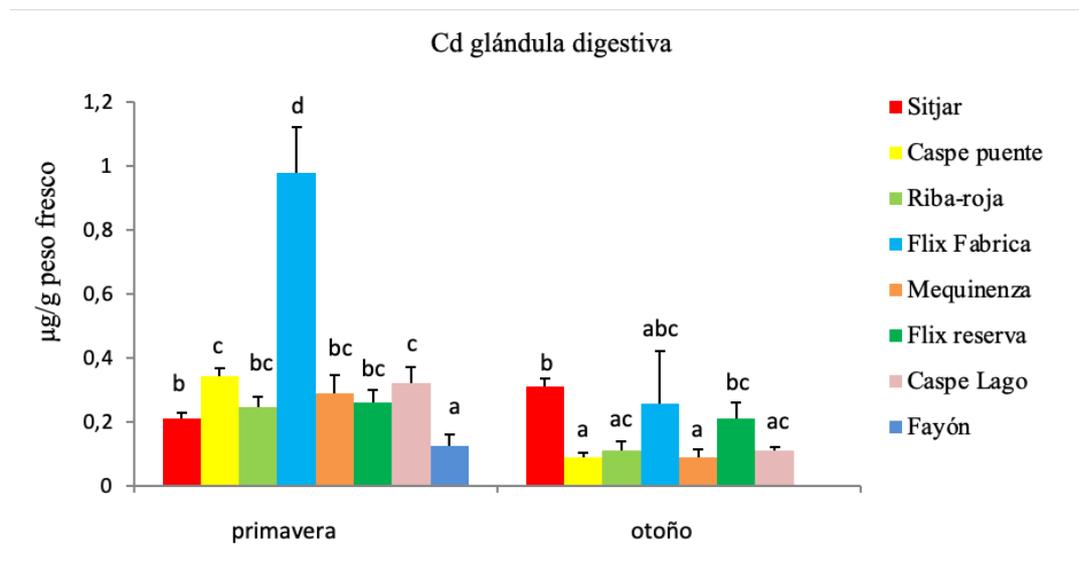


Figura 9. Contenido de Cd ($\mu\text{g/g}$) en glándula digestiva de *D. polymorpha* durante primavera y otoño en las poblaciones estudiadas. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (DS). Las diferentes letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre poblaciones para una misma estación (ANOVA de una vía y *post hoc* Tuckey).

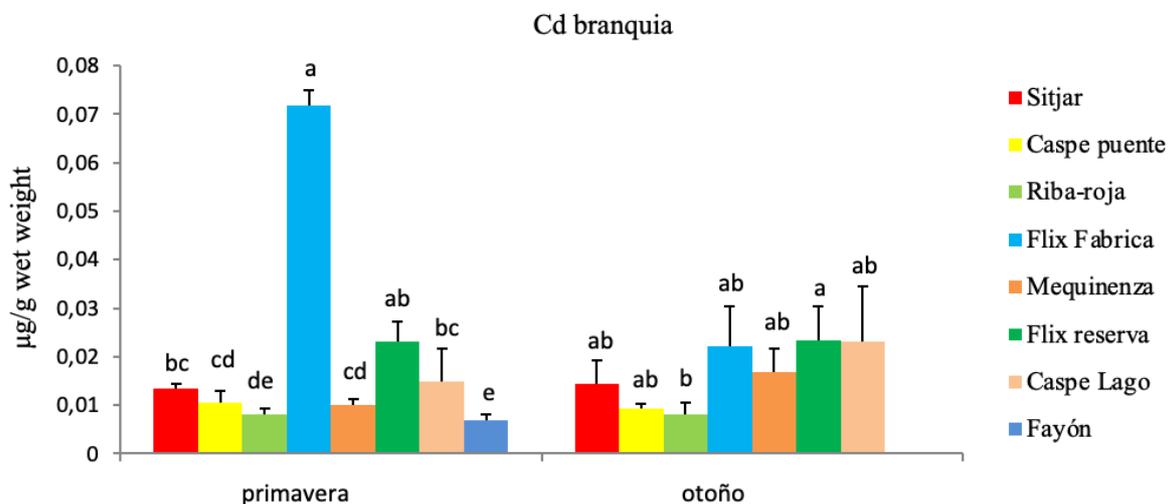


Figura 10. Contenido de Cd ($\mu\text{g/g}$) en branquia de *D. polymorpha* durante primavera y otoño en las poblaciones estudiadas. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (DS). Las diferentes letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre poblaciones para una misma estación (ANOVA de una vía *y post hoc* Tuckey).

FF es la población con mayor nivel de Cd en diferentes tejidos de *D. polymorpha*, en consonancia con lo encontrado por otros autores (ver Tabla 3) en tejido blando y en el animal entero de las mismas poblaciones objeto de este estudio. En las poblaciones de FR, MEQ, RB y SIT existe similitud entre las concentraciones de Cd en glándula digestiva con las determinadas en el animal entero por Navarro et al. (2013), sin embargo, hay diferencias claras con respecto a los datos obtenidos en tejido blando y animal entero por Faria et al. (2010), Alcaraz et al. (2011) y Soto et al. (2011).

Si comparamos los valores de Cd en branquias con respecto a los encontrados en glándula digestiva observamos diferencias, siendo diez veces menor el nivel de Cd en las branquias que en la glándula digestiva. Por otra parte, algunos estudios de exposición a cadmio realizados en laboratorio en diferentes poblaciones de mejillón cebra europeas y de Estados Unidos (Tabla 4) detallan las concentraciones de metales presentes en los organismos controles (Bervoets et al., 2005, Voets et al., 2004; Bourgeault et al., 2010), de forma que podemos establecer una comparación entre el control o nivel basal de los mejillones cebra con nuestros datos de campo. En estos trabajos los individuos de los grupos control presentan

concentraciones de Cd en tejido blando (incluyendo también el manto) en un rango que coincide con el rango de concentraciones encontradas en el presente estudio en la glándula digestiva.

Tabla 3. Concentraciones de Cd en diferentes tejidos de *D. polymorpha* determinadas por varios autores en las poblaciones estudiadas en el presente trabajo.

AÑO MUESTREO	TEJIDO C_{tissue} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$)	FF	FR	FAY	CAS1	CAS2	RB	MEQ	SIT	AUTOR
Primavera 2009	Glándula digestiva	0,98	0,26	0,12	0,34	0,32	0,25	0,29	0,21	Presente trabajo
	Branquia x(10 ⁻²)	7,17	2,31	0,69	1,06	1,48	0,82	1,00	1,33	
2008 y 2009	Tejido blando	1,1	0,37	0,17			0,29	0,13	0,37	Navarro et al., (2013)
2006	Animal entero		0,15				0,08			Barata et al., (2009)
Otoño 2008	Tejido blando	0,63					0,037	0,081		Alcaraz et al., (2011)
Verano 2006	Tejido blando	1,00	0,04							Soto et al., (2011)
Verano 2014	Tejido blando		0,17							Benito et al., (2017)

Tabla 4. Concentraciones de Cd en diferentes tejidos de *D. polymorpha* determinadas por varios autores en las poblaciones europeas.

AÑO MUESTREO	TEJIDO C_{tissue} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$)	CONTROL	EXPOSICIÓN	LOCALIDAD	AUTOR
Verano 2008	Tejido blando			Río Meuse, Francia	Bourgeault et al. (2010)
Invierno 2009		0,10	0,81		
2009	Tejido blando	2,43	63,72	Río Drava, Croacia	Ivankovic et al. (2010)
Invierno 2001	Tejido blando	1,35	11,34	Embalse de Antwerpse Waterwerkenin Duffel, Bélgica	Voets et al. (2004)
Primavera y otoño 2014	Tejido blando		0,040	Río Rhin, Alemania	Kerambrun et al., (2016)
2014	Tejido blando		0,70	Lago Michigan, USA	Shoults-Wilson et al.,(2015)

Mercurio

Las concentraciones de Hg determinadas en la glándula digestiva y en las branquias se muestra en las Figuras 11 y 12. El valor más alto se encuentra en glándula digestiva en la localización de FF durante primavera de 2009, siendo este valor significativamente diferente a los encontrados en las demás poblaciones de estudio.

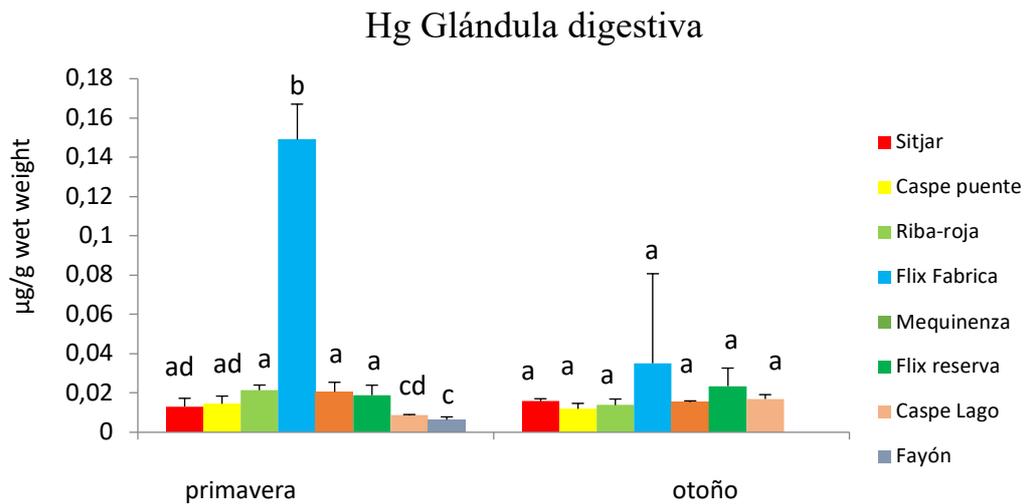


Figura 11. Contenido de Hg ($\mu\text{g/g}$) en glándula digestiva de *D. polymorpha* durante primavera y otoño en las poblaciones estudiadas. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (DS). Las diferentes letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre poblaciones para una misma estación (ANOVA de una vía y *post hoc* Tuckey).

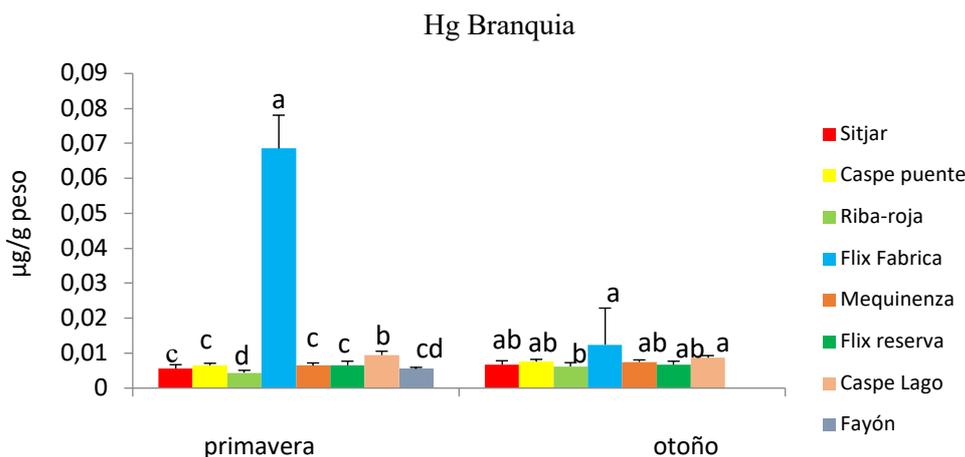


Figura 12. Contenido de Hg ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) en branquia de *D. polymorpha* durante primavera y otoño en las poblaciones estudiadas. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (DS). Las diferentes letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre poblaciones para una misma estación (ANOVA de una vía y *post hoc* Tuckey).

El rango de las concentraciones de mercurio (Hg) encontradas en branquia y glándula digestiva son comparables con los obtenidos en tejido blando por otros autores como Alcaraz et al. (2011), Navarro et al. (2013) y Benito et al. (2017), en las mismas poblaciones elegidas en este estudio, y con otras poblaciones localizadas en Alemania (Flieger et al., 2014), Canadá (Kraemer et al., 2013) y USA (Wilson-Shoults et al., 2015) (ver tablas 5 y 6). Sin embargo, son diferentes a los encontrados por Faria et al. (2010) y Soto et al. (2011) cuyos resultados para el contenido en Hg en organismo entero son hasta cien veces mayores que los valores encontrados en este estudio en ambos tejidos para las mismas poblaciones.

Se ha encontrado que el Hg se acumula de forma preferencial en glándula digestiva, coincidiendo también con los resultados de otros autores (ver tabla 5 y 6). Un factor importante para explicar las diferencias de ejemplares capturados en diferentes localidades puede ser el tamaño del organismo y el consecuente efecto de dilución del metal (Mersch y Pihan, 1993; Roditi y Fisher, 1999; Kwan et al., 2003), aunque en el presente trabajo se ha intentado minimizar esta variable.

Tabla 5. Concentraciones de Hg en diferentes tejidos de *D. polymorpha* determinadas por varios autores en las poblaciones de estudio elegidas en el presente trabajo.

AÑO MUESTREO	TEJIDO C_{tissue} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$)	FF	FR	FAY	CAS1	CAS2	RB	MEQ	SIT	AUTOR
Primavera 2009	Glándula digestiva (10^{-2})	14,91	1,89	0,64	1,46	0,87	2,14	2,06	1,31	Presente trabajo
	Branquia x(10^{-2})	6,86	0,65	0,55	0,65	0,95	0,44	0,64	0,56	
2008 y 2009	Tejido blando x(10^{-2})	32,4	5,4	2,1			3,7	2,7	6,2	Navarro et al., (2013)
2006	Animal entero	0,50								Barata et al., (2009)
Otoño 2008	Tejido blando x(10^{-2})		15				8	1		Alcaraz et al., (2011)
Verano 2006	Tejido blando		1,21							Soto et al., (2011)
Verano 2014	Tejido blando x(10^{-2})		2,7							Benito et al., (2017)

Tabla 6. Concentraciones de Hg en diferentes tejidos de *D. polymorpha* determinadas por varios autores en las poblaciones europeas, Estados Unidos y Canadá.

AÑO MUESTREO	TEJIDO C_{tissu} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$)	CONTROL	EXPOSICIÓN	LOCALIDAD	AUTOR
Invierno 2014	Tejido blando	0,9		Lake Michigan, USA	Shoults-Wilson et al., (2015)
2006-2009	Tejido blando	0,15		Elbe Saale Lake Belau, Alemania	Fliedner et al. (2014)
2008-2009	Animal entero	0,023		Kawartha lake, Canadá	Kraemer et al. (2013)

La existencia de partículas sólidas y de carbono en suspensión que forman complejos estables con Hg son retenidas por los organismos a través de su alimentación (Kraemer et al., 2013), pudiendo dar lugar a diferencias de acumulación entre las diferentes poblaciones de

mejillón cebra estudiadas. La variabilidad estacional es un factor importante a tener en cuenta, la mayor acumulación de Hg se produce en primavera (ver Figura 13 y 14) coincidente con la maduración de células germinales (Villarroel et al., 2016) y la acumulación de lípidos en las gónadas.

Plomo

La población con mayores niveles de Pb en sus tejidos es SIT, alcanzándose el valor más alto en otoño (ver Figuras 13 y 14). Todas las poblaciones presentan en otoño una media de $0,15\mu\text{g g}^{-1}$ de Pb en glándula digestiva, excepto en SIT donde los niveles de Pb alcanzan un valor cuatro veces superior. En branquia sucede algo similar. Al igual que lo visto para los metales tóxicos Cd y Hg el tejido de acumulación preferente es la glándula digestiva. En ejemplares recogidos simultáneamente en este estudio y en Navarro et al., (2011), ver tabla 7, también se encontró que SIT presentaba el valor más alto de Pb en tejido blando.

En el presente trabajo la diferencia en el contenido en Pb encontrado en SIT con las demás poblaciones es mayor de forma proporcional en branquia que en glándula digestiva.

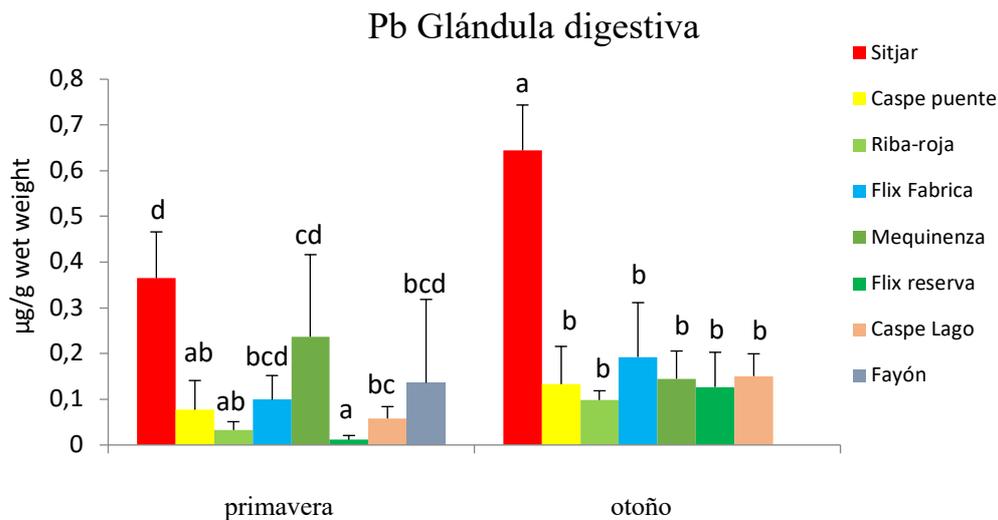


Figura 13. Contenido de Pb ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) en glándula digestiva de *D. polymorpha* durante primavera y otoño en las poblaciones estudiadas. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (DS). Las diferentes letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre poblaciones para una misma estación (ANOVA de una vía y *post hoc* Tuckey).

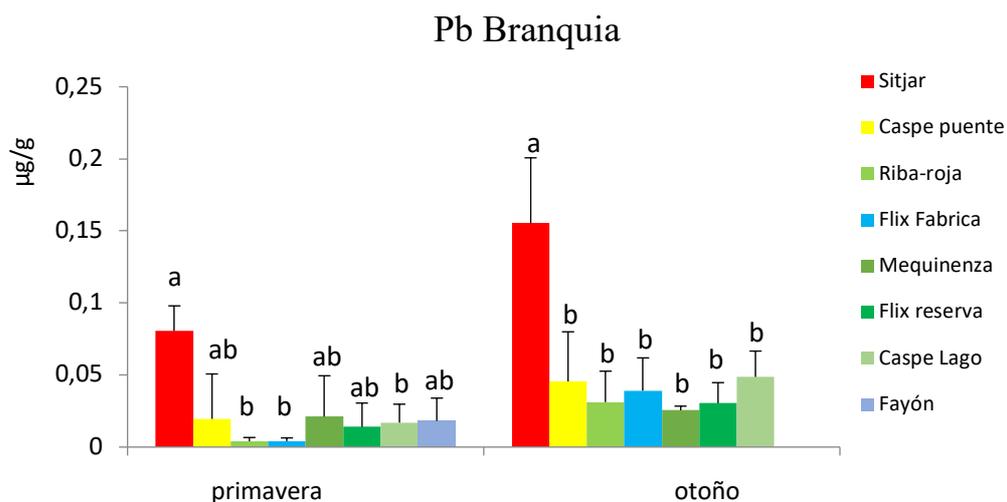


Figura 14. Contenido de Hg ($\mu\text{g/g}$) en branquia de *D. polymorpha* durante primavera y otoño en las poblaciones estudiadas. Los valores se expresan como media desviación \pm estándar (DS). Las diferentes letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre poblaciones para una misma estación (ANOVA de una vía *y post hoc* Tuckey).

Como se puede ver en las tablas 7 y 8 los valores de Pb obtenidos en el presente trabajo en las poblaciones de MEQ y SIT en glándula digestiva son semejantes a los obtenidos en tejido blando por Lebrun et al. (2017) y Kerambrun et al. (2018). Sin embargo, en los estudios de Fliedner et al. (2014) encontraron valores de Pb en tejido blando diez veces mayores que los encontrados en el presente trabajo.

Tabla 7. Concentraciones de Pb en diferentes tejidos de *D. polymorpha* determinadas por varios autores en las poblaciones de estudio elegidas en el presente trabajo.

AÑO MUESTREO	TEJIDO C_{tissue} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$)	FF	FR	FAY	CAS1	CAS2	RB	MEQ	SIT	AUTOR
Primavera 2009	Glándula digestiva	0,10	0,01	0,14	0,08	0,06	0,03	0,24	0,37	Presente trabajo
	Branquia x(10 ⁻²)	0,41	1,40	1,82	1,96	1,70	0,41	2,12	8,06	
2008 y 2009	Tejido blando	0,64	0,59	0,13			0,37	0,21	9,37	Navarro et al., (2013)
2006	Músculo abdominal <i>Procambarus clarkii</i>	0,03					0,05			Suarez-Serrano et al., (2010)
Otoño 2008	Tejido blando		0,55				0,12	0,23		Alcaraz et al., (2011)
Verano 2006	Tejido blando		0,01							Soto et al., (2011)
Verano 2014	Tejido blando		0,48							Benito et al., (2017)

Tabla 8. Concentraciones de Hg en diferentes tejidos de *D. polymorpha* en poblaciones europeas.

AÑO MUESTREO	TEJIDO	CONTROL C_{tissue} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{pf}$)	EXPOSICIÓN	LOCALIDAD	AUTOR
2005-2009	Tejido blando	1,20		Río Zehren Alemania	<u>Fliedner</u> et al. (2014)
Primavera 2013	Tejido blando	0,32		Presa de Marckolsheim Río Rhine, Francia	Lebrun et al. (2017)
Verano 2015	Tejido blando	0,24		Río Oise, Francia	Kerambrum et al. (2018)

NOTA: Los valores han sido calculados a partir de los expresados como $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco utilizando un factor de corrección de 0,27.

Metales esenciales: cobre (Cu) y zinc (Zn)

Cobre

La población con mayor concentración de Cu en glándula digestiva es la de Caspe Lago (CAS2) en otoño (Figura15), mientras que todas las poblaciones tanto en primavera como en otoño muestran una media aproximada de $1,74\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en glándula digestiva. En branquia, SIT alcanza el valor más alto en primavera (Figura 16), siendo el nivel de Cu en el resto de las

poblaciones 1,6 veces menor que en la glándula digestiva. En FAY el nivel de Cu en glándula digestiva es menor que en branquia.

Las poblaciones presentan mayor homogeneidad en el contenido de Cu en ambas estaciones del año en la glándula digestiva, mientras que en las branquias sólo se mantiene constante el nivel de Cu en otoño. Kerambrun et al. (2014) también encontraron una mayor constancia en los niveles de Cu en el animal entero en otoño.

En las poblaciones de RB, MEQ, SIT, FF, y FR, los valores de Cu obtenidos en glándula digestiva en el presente trabajo son similares a los obtenidos en tejido blando por Alcaraz et al., (2011) y Navarro et al. (2013), veáse Tabla 9. Sin embargo, los estudios de Faria et al. (2010) y Soto et al. (2011) obtuvieron valores de Cu en tejido blando cuatro veces mayor en FF y tres veces más en SIT que los encontrados en este trabajo. Por el contrario, Faria et al. (2010) obtuvo valores de Cu en tejido blando 4,6 y 3,6 veces mayor en FF y SIT respectivamente que en este trabajo.

Como se puede observar en las Tabla 10 otros autores (Aksu et al.,2012; Lebrun et al., 2017; Shoults-Wilson et al., 2015; Strungaru et al., 2018) han obtenido, en trabajos de laboratorio valores de Cu en tejido blando comparables a los obtenidos en el presente trabajo, permitiendo explicar que este metal esencial está sometido a autorregulación y redistribución celular en función de las necesidades del organismo, desarrollando sistemas de almacenaje que garanticen su disponibilidad siendo la acumulación de Cu tejido-específica, y la glándula digestiva el tejido de acumulación preferente (Engelken et al., 1999 y Bebianno et al., 2009).

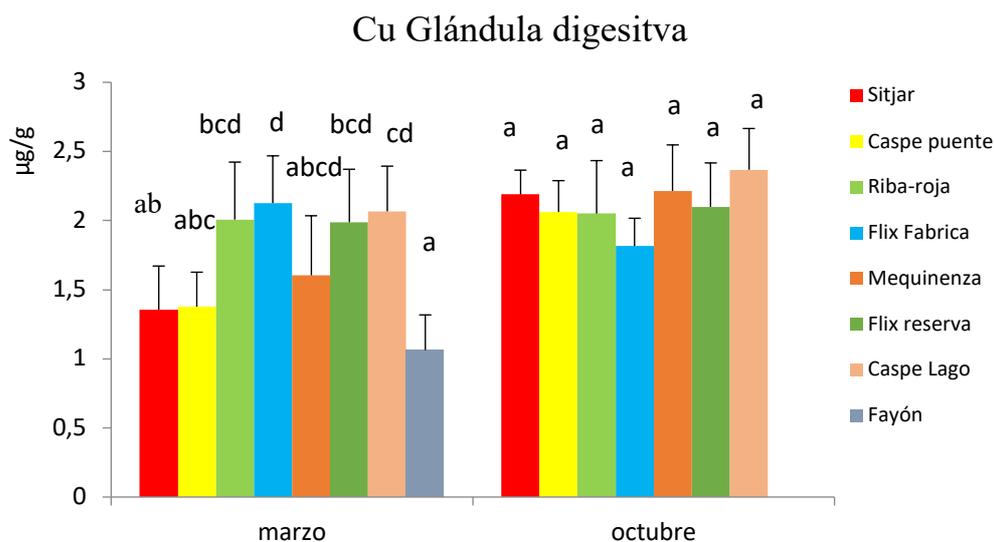


Figura 15. Contenido de Cu ($\mu\text{g/g}$) en glándula digestiva de *D. polymorpha* durante primavera y otoño en las poblaciones estudiadas. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (DS). Las diferentes letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre poblaciones para una misma estación (ANOVA de una vía y *post hoc* Tuckey).

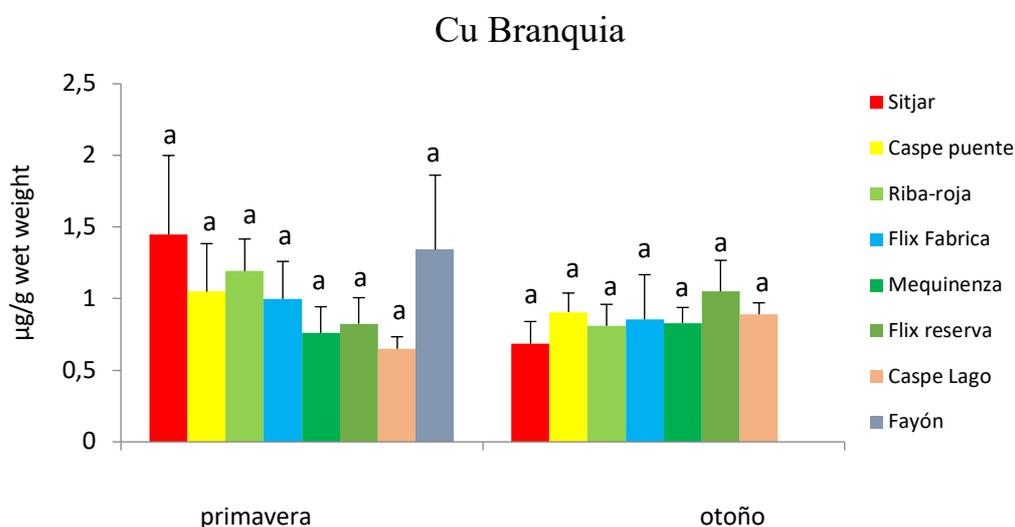


Figura 16. Contenido de Cu ($\mu\text{g/g}$) en branquias de *D. polymorpha* durante primavera y otoño en las poblaciones estudiadas. Los valores se expresan como media desviación \pm estándar (DS). Las diferentes letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre poblaciones para una misma estación (ANOVA de una vía y *post hoc* Tuckey).

Tabla 9. Concentraciones de Cu en diferentes tejidos de *D. polymorpha* obtenidos por varios autores en las poblaciones estudiadas en el presente trabajo.

AÑO MUESTREO	TEJIDO C _{tejido} µg g ⁻¹ pf	FF	FR	FAY	CAS1	CAS2	RB	MEQ	SIT	AUTOR
Primavera 2009	Glándula digestiva	2,13	1,99	1,06	1,38	2,07	2,01	1,60	1,36	Presente trabajo
	Branquia	1,00	0,83	1,34	1,05	0,65	1,19	0,76	1,45	
2008 y 2009	Tejido blando	2,27	2,1	0,71			1,50	0,73	1,7	Navarro et al., (2013)
2006	Animal entero	9,65							5,14	Barata et al., (2009)
Otoño 2008	Tejido blando	5,7					2,06	2,24		Alcaraz et al., (2011)
Verano 2006	Tejido blando	6,26								Soto et al., (2011)
Verano 2014	Tejido blando		3,52							Benito et al., (2017)

Tabla 10. Concentraciones de Cu en diferentes tejidos de *D. polymorpha* obtenidos por varios autores en poblaciones europeas.

AÑO MUESTREO	TEJIDO	CONTROL C _{tejido} µg g ⁻¹ pf	EXPOSICIÓN	LOCALIDAD	AUTOR
Verano 2014- Primavera 2015	Tejido blando	0,93		Río Prut, Rumanía	Strungaru et al., (2018)
Primavera 2013	Tejido blando	3,51		Río Rhine, Cqnal de Alsacia, Francia	Lebrun et al., (2017)
	Tejido blando	0,95		Lago Michigan, Chicago, USA	Shoultz-Wilson et al., (2015)
Verano 2009	Peso de la concha	2,2		Río Ontario, Canadá	Zhong et al. (2015)
	Tejido blando	1,02		Lago de Keban, Turquía	Aksu et sl., (2012)

NOTA: Los valores han sido calculados a partir de los expresados como µg g⁻¹ peso seco utilizando un factor de corrección de 0,27.

Zinc

En las diferentes poblaciones de estudio se observa constancia en los valores de Zn alcanzados en glándula digestiva durante la estación de primavera, siendo más variable en otoño. En branquia los niveles mayores de Zn se encuentran en primavera en todas las poblaciones estudiadas siendo 1,5 veces mayores que en otoño.

b

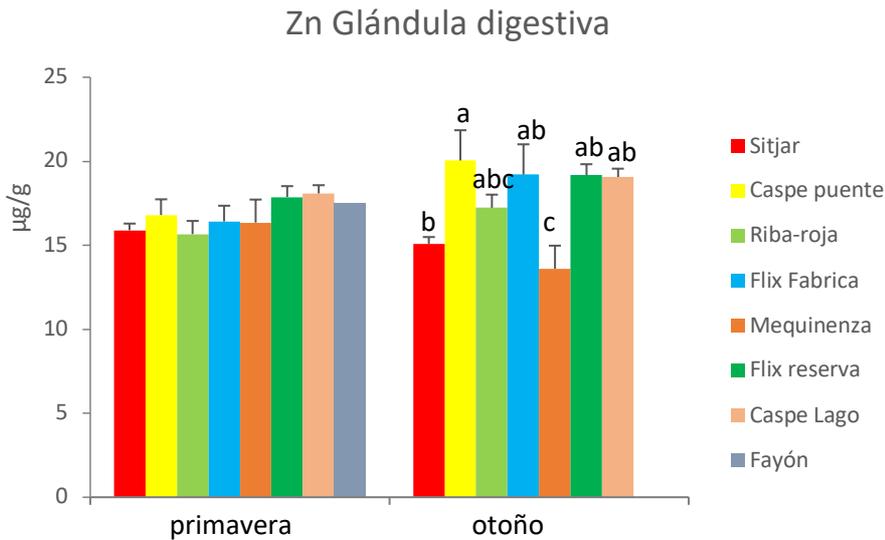


Figura 17. Contenido de Zn ($\mu\text{g/g}$) en glándula digestiva de *D. polymorpha* durante primavera y otoño en las poblaciones estudiadas. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (DS). Las diferentes letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre poblaciones para una misma estación (ANOVA de una vía y *post hoc* Tuckey).

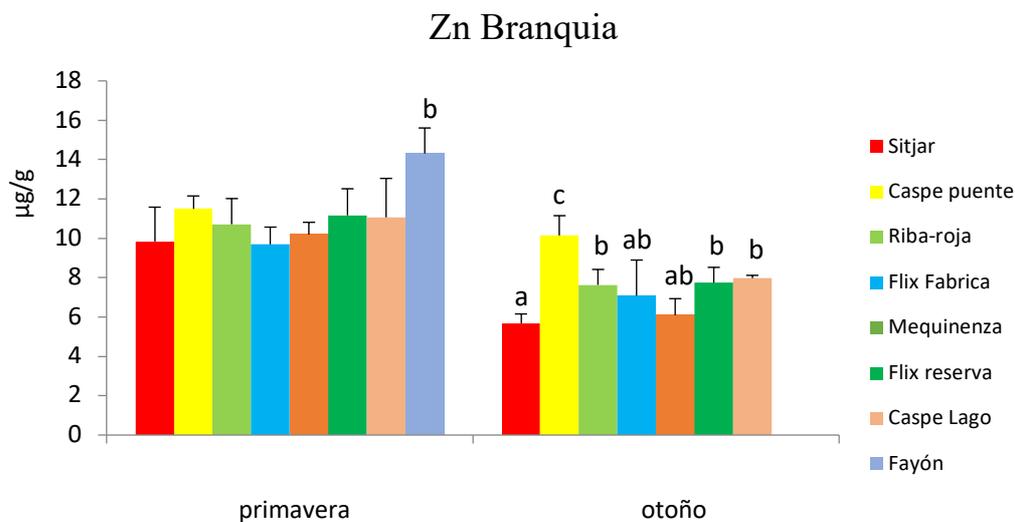


Figura 18. Contenido de Zn ($\mu\text{g/g}$) en branquia de *D. polymorpha* durante primavera y otoño en las poblaciones estudiadas. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (DS). Las diferentes letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre poblaciones para una misma estación (ANOVA de una vía y *post hoc* Tuckey).

Como se observa en las tablas 11 y 12 otros autores (Faria et al., 2010; Navarro et al., 2013; Benito et al., 2017 y Kerambrun et al., 2018) han obtenido valores de Zn en tejido blando

entre 4 y 3 veces mayores que los encontrados en el presente estudio en los dos tejidos analizados (glándula digestiva y branquias).

Tabla 11. Contenido de Zn en diferentes tejidos de *D. polymorpha* determinados por varios autores en las poblaciones estudiadas en el presente trabajo.

AÑO MUESTREO	TEJIDO C_{tejido} $\mu\text{g g}^{-1}\text{pf}$	FF	FR	FAY	CAS1	CAS2	RB	MEQ	SIT	AUTOR
Primavera 2009	Glándula digestiva	16,42	17,87	17,49	16,80	18,08	15,67	16,35	15,89	Presente trabajo
	Branquia	9,69	11,17	14,31	11,50	11,06	10,71	10,19	9,84	
2008 y 2009	Tejido blando	60,00	58,88	43,28			53,29	43,79	69,39	Navarro et al., (2013)
2006	Animal entero	35,05							24,05	Barata et al., (2009)
Otoño 2008	Tejido blando		27,11				22,26	23,86		Alcaraz et al., (2011)
Verano 2006	Tejido blando		6,26							Soto et al., (2011)
Verano 2014	Tejido blando		29,85							Benito et al., (2017)

Tabla 12. Contenido de Zn en diferentes tejidos de *D. polymorpha* determinados por varios autores en las poblaciones europeas.

AÑO MUESTREO	TEJIDO	CONTROL C_{tejido} $\mu\text{g g}^{-1}\text{pf}$	EXPOSICIÓN	LOCALIDAD	AUTOR
2012-2013	Tejido blando	0,004		Lago Saint-François Québec, Canadá	Gagné et al., (2019)
Otoño 2014	Glándula digestiva	72,63		Río Oise, Francia	Kerambrun et al., (2018)

NOTA: Los valores han sido calculados a partir de los expresados como $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco utilizando un factor de corrección de 0,27.

Al igual que Cu, este metal esencial está sometido a autorregulación en bivalvos (Langston W.J., Bebianno et al., 2011), realizándose la distribución celular en función de la necesidad de las distintas particiones celulares existiendo movilidad entre ellas. La eliminación de Zn sucede por diferentes vías: excreción celular, retención en orgánulos mineralizados y unión a metaloproteínas. El contenido de Zn es básico para el desarrollo y crecimiento celular, estando implicado en mecanismos homeostáticos que regulan la absorción, distribución, asimilación y excreción. En bivalvos el exceso de metal en cada compartimento tendrá un

patrón de eliminación diferente, de forma que primero se eliminará de la glándula digestiva después de las branquias y del resto de tejidos (Langston y Bebianno 2010).

Potasio

El rango concentración de K en glándula digestiva en primavera se encuentra entre 1000-1370 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ siendo Caspe puente (CAS1) la población con mayor nivel de K. Las poblaciones de FR y Sitjar SIT son 2,4 y 3,4 veces menor respectivamente que el resto de las poblaciones. En otoño CAS1 sigue siendo la población con mayor nivel de K, y SIT es la localidad con menor concentración de K siendo 2 veces inferior al resto de poblaciones.

La media de concentración de K en branquia es menor que en glándula digestiva, siendo 3 veces inferior en primavera y 4 veces inferior en otoño. CAS2 es la población con mayor nivel de K en primavera y CAS1 es en otoño (ver figuras 19 y 20). Los valores de K obtenidos por Benito et al. (2017) en tejido blando de ejemplares procedentes de FR son semejantes a los obtenidos en el presente trabajo. Por el contrario, Rutzke et al. (2000) obtuvo una concentración de K en tejido blando (que incluye el manto además de las branquias y la glándula digestiva) en individuos del Lago Ontario (Canadá) que es diez veces inferiores a los valores encontrados en el presente trabajo.

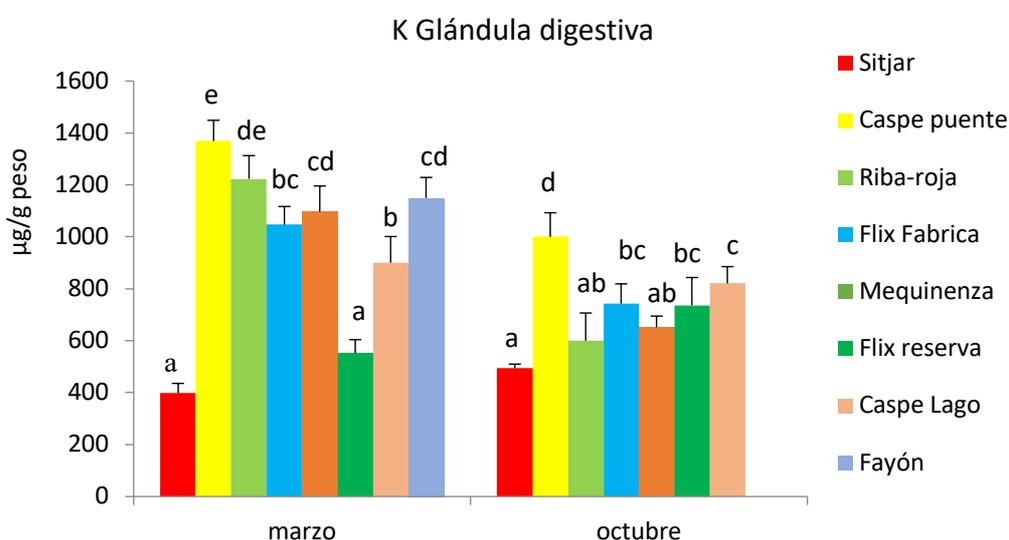


Figura 19. Contenido de K ($\mu\text{g}/\text{g}$) en glándula digestiva de *D. polymorpha* durante primavera y otoño en las poblaciones estudiadas. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (DS). Las diferentes letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre poblaciones para una misma estación (ANOVA de una vía y *post hoc* Tuckey).

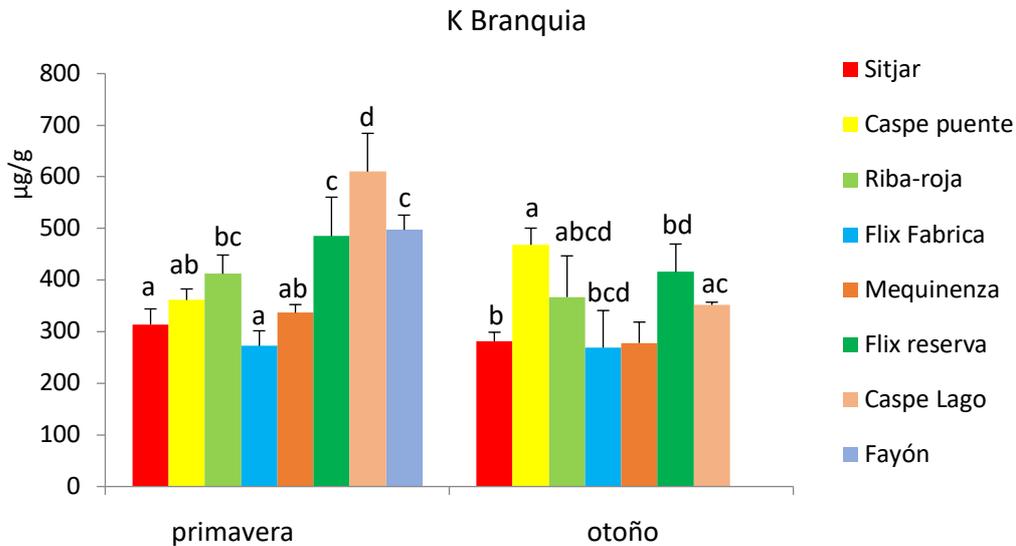


Figura 20. Contenido de K ($\mu\text{g/g}$) en branquia de *D. polymorpha* durante primavera y otoño en las poblaciones estudiadas. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (DS). Las diferentes letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre poblaciones para una misma estación (ANOVA de una vía *y post hoc* Tuckey).

Tabla 13. Contenido en K en diferentes tejidos de *D. polymorpha* determinado por varios autores en las poblaciones de estudio en el presente trabajo.

AÑO MUESTREO	TEJIDO <small>C_{tejido} $\mu\text{g g}^{-1}\text{pf}$</small>	FF	FR	FAY	CASI	CAS2	RB	MEQ	SIT	AUTOR
Primavera 2009	Glándula digestiva	1046,49	553,13	1149,64	1369,18	900,17	1223,45	1096,94	398,75	Presente trabajo
	Branquia	272,40	485,05	497,43	361,48	610,03	412,21	336,81	314,03	
Verano 2014	Tejido blando		615,30							Benito et al., (2017)

El K, implicado en la regulación y control del volumen celular en bivalvos de agua dulce Dietz y Findley (1980), presentó variabilidad inter-estacional, inter-poblacional y entre diferentes tejidos (Figuras 19 y 20.) Los autores anteriormente citados sugieren que el lugar donde se transportan los iones de potasio dentro del mejillón cebra son las branquias, y que este transporte activo se realiza en cantidad suficiente para mantener el estado de equilibrio o de acumulación neta aportando una significativa contribución al balance total de potasio.

El mejillón cebra es una especie de agua dulce osmorreguladora y estenohalina que presenta muy poca tolerancia al exceso de sales minerales (Horohov et al., 1992 y Meddler et al., 1999). Por otro lado, el mejillón cebra es incapaz de sobrevivir por encima de 1mM de concentración de K. La combinación del transporte epitelial activo y la alta permeabilidad pasiva deriva en la imposibilidad de sobrevivir en niveles elevados de K en agua dulce (Dietz et al., 1980 y McCorkle-Shirley et al., 1982).

3.2. Respuestas fisiológicas y bioquímicas

3.2.1. Actividad enzimática de Na⁺/K⁺-ATPasa en branquia

La actividad Na⁺/K⁺-ATPasa en las branquias de las poblaciones estudiadas se sitúa en un rango de 1,27-2,59 μmol Pi/mg proteína/hora en primavera, y de 0,87-1,20 μmol Pi/mg proteína/hora en otoño (Figura 21). Las poblaciones con mayor actividad de enzima son Flix Fábrica (FF) y Flix reserva (FR), siendo esta 2 veces mayor en primavera que en otoño, excepto en Caspe puente (CAS1) cuyos valores son similares en ambas estaciones (Figura 21). Las poblaciones de Fayón (FAY), Caspe puente (CAS1) y Riba roja (RR) presentan los valores más bajos de actividad enzimática.

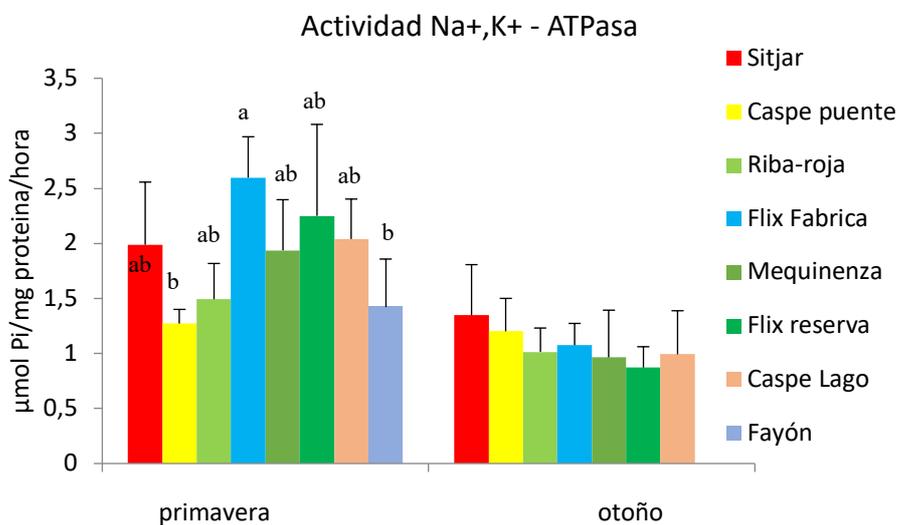


Figura 21. Actividad Na⁺/K⁺-ATPasa (μmol Pi/mg proteína/hora) en branquia de *D. polymorpha* durante primavera y otoño en las poblaciones estudiadas. Los valores se expresan como media ± desviación estándar (DS). Las diferentes letras indican las diferencias significativas (p<0,05) entre poblaciones para una misma estación (ANOVA de una vía y *post hoc* Tuckey).

Otros autores (Pagliarini et al., 1996) ha obtenido valores de actividad de Na⁺/K⁺-ATPasa en tejidos de *Mitylus galloprovincialis* y *Crassostrea rhizophorae* semejantes a los valores encontrados en branquia en el presente trabajo (tablas 14 y 15).

Tabla 14. Valores obtenidos para la actividad de Na⁺/K⁺-ATPasa en branquia de *D. polymorpha* en las poblaciones en el presente trabajo.

AÑO MUESTREO	TEJIDO C _{branquia} μmol Pi/mg proteína*hora	FF	FR	FAY	CAS1	CAS2	RB	MEQ	SIT	AUTOR
Branquia	Primavera	2,59	2,25	1,42	1,27	2,03	1,57	1,93	1,98	Presente trabajo
	Otoño	1,07	0,87	-	1,20	0,99	1,01	0,965	1,34	

Tabla 15. Valores obtenidos para actividad de Na⁺/K⁺-ATPasa en diferentes tejidos de moluscos bivalvos por varios autores en las poblaciones europeas.

AÑO MUESTREO	TEJIDO	CONTROL	EXPOSICIÓN	LOCALIDAD	AUTOR
2006	Tejido homogeneizado	0,38		University of Cambridge, UK	Bouskill et al., (2006)
2006	Manto y branquia <i>M. galloprovincialis</i>	1,2		Northern Adriatic Sea	Pagliarini et al., (2006)
Invierno-verano 2004	<i>Braquia Crassostrea rhizophorae</i>	2,2		Itamaracá Bay, Brasil	Valdez Domingos et al., (2007)

3.2.2 Metalotioneína (MT) en glándula digestiva y branquia

Los valores obtenidos de MT en glándula digestiva (Figura 22) en primavera se sitúan en un rango de 1.300-2.800 μg/g, siendo Mequinenza (MEQ) la población de mayor valor y observándose una importante variabilidad entre poblaciones. En otoño el nivel de MT fue 1,6 veces menor que en primavera, existiendo poca variabilidad entre poblaciones.

MT glándula digestiva

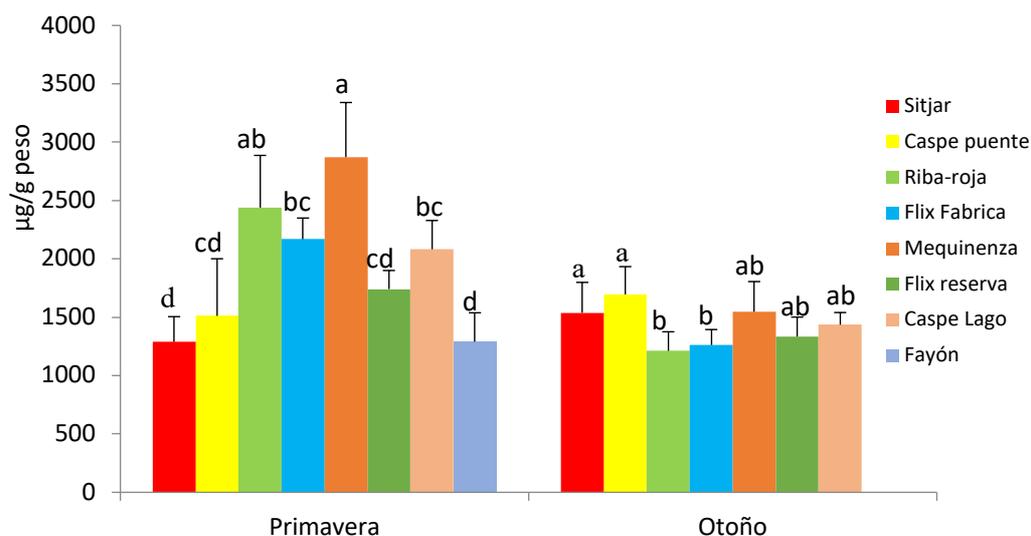


Figura 22. Contenido de MT ($\mu\text{g/g}$) en glándula digestiva de *D. polymorpha* durante primavera y otoño en las poblaciones estudiadas. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (DS). Las diferentes letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre poblaciones para una misma estación (ANOVA de una vía y *post hoc* Tuckey).

MT branquias

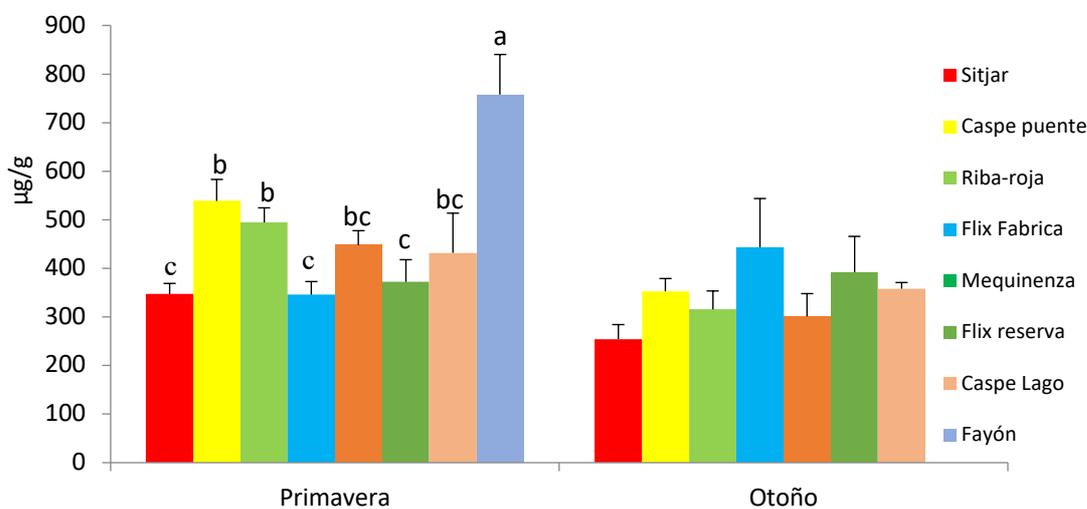


Figura 23. Contenido de MT ($\mu\text{g/g}$) en branquia de *D. polymorpha* durante primavera y otoño en las poblaciones estudiadas. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar (DS). Las diferentes letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre poblaciones para una misma estación (ANOVA de una vía y *post hoc* Tuckey).

El estudio de correlaciones de Pearson indica que el contenido en MT en branquia se correlaciona de forma negativa con el contenido de Cd ($r=-0,71$, $p<0,001$) y de Hg ($r=-0,366$, $p<0,05$). Sin embargo, en la glándula digestiva el contenido de MT presenta una correlación positiva con el contenido de Cd ($r=0,37$, $p<0,05$) y Hg ($r=0,427$, $p<0,01$).

En primavera, FAY es la población con mayor nivel de MT en branquias (Figura 23), el resto de las poblaciones presenta un rango de 300-700 $\mu\text{g/g}$; mientras que en otoño el rango es de 200-400 $\mu\text{g/g}$ sin que exista gran variabilidad entre poblaciones. Comparando con los estudios previos realizados por Navarro et al. (2009) y López-Doval et al. (2015) podemos observar que no hay diferencias entre las poblaciones de estudio elegidas, ya que no podemos comparar las unidades de medida en los tejidos estudiados (tabla 17).

En las poblaciones europeas estudiadas por varios autores (tabla 16) ocurre algo similar, el nivel de MT obtenido en animal entero por Frank et al., 2008 e Ivankovic et al., (2010) es similar al obtenido en glándula digestiva en nuestro trabajo (tabla 17). Algo similar se puede decir de los valores de MT determinados en branquia por Lecoeur et al. (2004) y Kerambrun et al., (2016).

Tabla 16. Concentraciones de MT en diferentes tejidos de *D. polymorpha* determinados por varios autores en las poblaciones de estudio elegidas en el presente trabajo.

AÑO MUESTREO	TEJIDO C _{tejido} $\mu\text{g/g}$	SIT	CAS1	RR	FF	MEQ	FR	CAS2	FAY	AUTOR
Primavera 2009	Glándula digestiva	1289,21	1512,59	2439,31	2169,70	2872,71	1741,48	2082,72	1291,32	Presente trabajo
	Branquia	346,72	538,70	494,42	345,98	447,56	372,11	431,93	757,840	
Primavera 2006	Tejido blando	839,40	939,72				790,82			Barata et al., (2009)
Invierno 2006	Hígado de <i>Cyprinus carpio</i>			1870			1136			Navarro et al., (2009)
2006	Tejido blando			476,4			566,1			López-Doval et al., (2015)

Tabla 17. Concentraciones de MT determinadas en diferentes tejidos de *D. polymorpha* por varios autores en las poblaciones europeas.

AÑO MUESTREO	TEJIDO	CONTROL C _{tissue} µg/g	EXPOSICIÓN	LOCALIDAD	AUTOR
Primavera 1993	Tejido blando	327		Río St. Lawrence, Canadá	High et al., (1997)
Primavera 2005	Tejido blando	900		Lago Mondsee, Austria	Frank et al., (2008)
Invierno 2002	Branquia	512		Lago Geneva, Thonon les Bains, Francia	Lecoeur et al., (2004)
2009	Tejido blando	1490		Río Drava, Croacia	Ivankovic et al., (2010)
Verano 2014	Branquia	580		Río Oise, Francia	Kerambrun et al., (2016)

3.3 Expresión proteica en branquia

Resultados obtenidos con 2D DIGE-MS

Los valores obtenidos con DeCyder™ software, han permitido detectar y emparejar 3626 proteínas, de las cuales 161 presentaron diferencias significativas en su abundancia con un nivel de significación del 95% ($p \leq 0,05$) en las poblaciones estudiadas de *D. polymorpha*. El método de clusterización jerárquica de los patrones de expresión de las proteínas de las branquias con cambios significativos ($p \leq 0.05$) en su abundancia permitió separar las diferentes poblaciones (Figura 24).

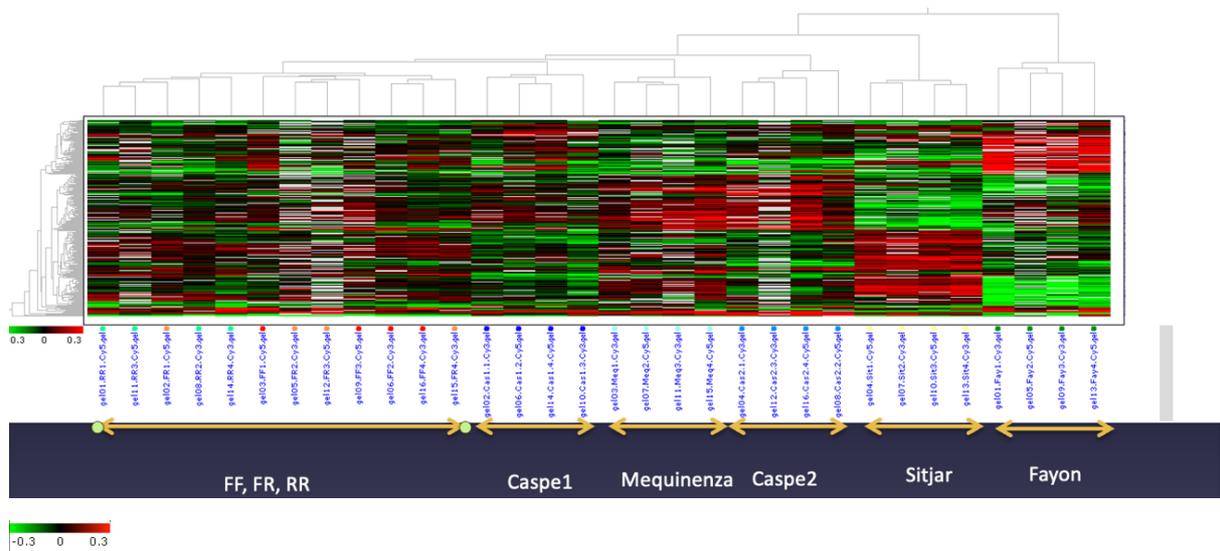


Figura 24. Gráfico de calor o “heatmap” de distribución de las proteínas con cambios significativos en la abundancia en branquias de en las diferentes poblaciones estudiadas. El color verde indica las proteínas con menor abundancia, en rojo las de mayor abundancia y en negro sin cambios.

Las poblaciones de Fayón (FAY) y Sitjar (SIT) presentaron patrones de expresión similares, donde la mayoría de las proteínas mostraron una menor abundancia, en comparación con el resto de las poblaciones. En las poblaciones de Caspe puente (CAS1), Caspe Lago (CASP2) y Mequinenza (MEQ), situadas corriente arriba en el río Ebro donde la contaminación por metales tóxicos (Cd, Pb y Hg) es menor que en el resto de las localizaciones, también mostraron un patrón de expresión similar sin un claro dominio entre las proteínas de mayor y menor abundancia. Sin embargo, en las poblaciones de Flix (FF, FR), situadas corrientes abajo en el río Ebro, con valores más altos de contaminación por metales tóxicos debido a su proximidad geográfica con la planta industrial, no se observó en el patrón de expresión con un predominio de proteínas con mayor o menor abundancia.

En las tablas 18 y 19 se muestran las 35 proteínas con expresión diferencial seleccionadas a partir del análisis 2D-DIGE, que fueron identificadas por espectrometría de masas (MS) en las diferentes poblaciones de *D. polymorpha*.

Tabla 18. Proteínas identificadas por espectrometría de masas (MALDI-TOF TOF) en las poblaciones *D. polymorpha* estudiadas y agrupadas según su ratio de expresión. Valores del punto isoeléctrico (pI), peso molecular (MW), puntuación media (score) y p-valor del ANOVA

Ratio	SÍMBOLO	NOMBRE	GI	pI	MW	Puntuación	pvalue
>2	UPF0126	protein family UPF0126	gi 1356000542				3,52E-04
1-0,5	HSP90B	Heat shock cognate protein HSP 90-beta	gi 2129430600	4.95	83717	116	2,78E-03
	HSP83_TRYBB	heat shock protein 83	gi 70832975	5.15	81121	106	3,20E-03
	HSP90	Heat shock protein 90	gi 3256076	4.98	83009	167	7,22E-03
	THIOLASE	Thiolase	gi 827479694				8,53E-03
	SPTCB_DROME	Spectrin beta chain	gi 14286182		266316	74	4,06E-02
	RNA pol I	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	gi 81878711				2,38E-06
	VATB2_BOVIN	V-type proton ATPase subunit B brain isoform	gi 296484621	5.57	56883	140	8,34E-05
	TBA3_MESAU	Tubulin alpha-3 chain	gi 2025727988	4.94	50863	245	6,65E-10
	TBA2_PATVU	Tubulin alpha-2/alpha-4 chain	gi 1174593	5.34	22106	541-522-458-33369-337-316-270-268-94-208-147	2,63E-05
	TBA_ONCKE	Tubulin alpha chain	gi 1888969814	4.92	49967	201	2,35E-03
	TBB4_XENLA	Tubulin beta-4 chain	gi 147905746	5.95	38554	154-130	4,20E-05
	CALR_SCHMA	Calreticulin	gi 499349	4.79	50240	442-352-340-290-241--95	4,26E-06
	PRS6B_MANSE	26S protease regulatory subunit 6B	gi 1714782021	5.33	40118	98	1,99E-05
	RNA helicase	RNA helicase, ATP-dependent, DEAD-box,	gi 3023628	4.69	45540	110	4,29E-02
	ACT1_BOMMO	Actin, muscle-type A1	gi 187281814	5.01	47138	207-96	2,93E-03
	Desox. II	Deoxyribonuclease II	gi 2921841	5.46	41582	71	2,85E-05
	TBB_HALDI	Tubulin beta chain	gi 1066143	5.60	35066	107-81	4,62E-05
	NUDIX	NUDIX hydrolase domain		5.30	42248	78	4,88E-02
	ACT_LUMRU	Actin	gi 1695157				6,62E-06
	ACTC_PISOC	Actin	gi 160762		32363	51	1,57E-02
	Centromere	Centromere/kinetochore protein Zw10	gi 11387366	5.30	42164	209	2,90E-03
	Folylpolyglu	Folylpolyglutamate synthetase	gi 1345106	9.90	32840	74	2,78E-02
	Proteasome	Proteasome, alpha-subunit, conserved site	gi 23110942				2,97E-02
	Homeobox	Homeobox	gi 385750	9.41	21698	72-57	9,08E-05
	Brefeldin	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exch	gi 150417986				4,50E-02
	GTPase A	Ras small GTPase, Ras type	gi 902275467	5.22	42304	69	5,35E-03
	Zinc finger, B-box	B-box type zinc finger family protein	gi 106372626		41698	64	9,63E-03
	YR863_MIMIV	Putative ankyrin repeat protein R863	gi 82019384				3,20E-03
	GPCR_Rhodpsn	7TM GPCR, rhodopsin-like	gi 1376153056		22462	62	5,34E-03
	GPMA_METPP	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	gi 166991331	6.51	27320	94	5,41E-04
	Peptidase C1A	Peptidase C1A, papain C-terminal	gi 1743609628				5,34E-03
	CUB	CUB domain	gi 1743595178				1,31E-04
	CO1A1_BOVIN	Collagen alpha-1(I) chain	gi 164414425	5.60	139880	104	1,86E-02
	initiation factor 4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding	gi 1352435		20420	59	3,56E-04
<0.5							

Tabla 19. Términos de “Gene Ontology” (GO_ID) de las proteínas identificadas en las poblaciones de *D. polymorpha* estudiadas para los procesos biológicos, la función molecular y componente celular.

NOMBRE DE LA PROTEINA	ESPECIE	SÍMBOLO	GI	UNIPROT	p-valor	Proceso biológico GO_ID	Función molecular GO_ID	Compo. celular GO_ID
Heat shock cognate protein beta	<i>Gallus gallus</i>	HSP 90-beta	gi 2129430600	F1NC33	p-0,0027	Respuesta celular al calor. GO:00346050	Unión ATP GO: 0005524	Citosol GO: 0005829
						Plegamiento de proteínas GO:0006457	Unión a dominio específico GO: 0097718	Membrana plasmática GO: 00058686
						Proteína estabilizadora GO: 0050821	Unión a proteínas plegadas GO: 0051082	
Heat shock protein 83	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	HSP83_TRYBB	gi 70832975	P12861	0,0032	Respuesta al calor GO: 0009408	Unión a ATP GO: 0005524	Centrosoma GO: 0005813
						Plegamiento de proteínas GO: 0006457	Actividad de hidrólisis de ATP GO: 0016887	Nucleoplasma GO: 0005654
						Respuesta a proteína no plegadas GO: 0006986	Unión a proteínas no plegadas GO: 0051082	
						Repliegue de proteínas GO: 0042026		

NOMBRE DE LA	ESPECIE	SÍMBOLO	GI	UNIPROT	p-valor	Proceso biológico GO_ID	Función molecular GO_ID	C. celular GO_ID
PROTEINA								
Heat shock protein 90	<i>Brugia pahangi</i>	HSP90	gi 3256076	O61998	0,0072	Plegamiento de proteínas GO:0006457	Unión a ATP GO: 0005524 Actividad hidrolítica de ATP GO: 001687 Unión a proteínas no plegadas GO: 0051082	Citoplasma GO:0005737
Thiolase	<i>Drosophila nasuta</i>	Thiolase	gi 827479694	A0A0H5AQN3	0,0085	---	Actividad aciltransferasa GO: 0016747	----
Spectrin beta chain	<i>Drosophila melanogaster</i>	SPTCB_DROME	gi 14286182	Q00963	2,38E-06	Organización del citoesqueleto con filamentos de actina GO: 0030036 Desarrollo neuronal GO:0048666 Transmisión sináptica neuromuscular GO: 0007274 Recubrimiento filamentos de actina GO: 0051693 Regulación de la organización de membrana plasmática GO: 1903729	Unión a filamentos de actina GO:0051015 Unión a microtúbulos GO: 0008017 Unión a fosfolípidos GO: 0005543 Unión a proteínas citoesqueléticas GO: 0008092 Unión a calmodulina GO: 0005516	Actina cortical Citoesqueleética GO: 0030864 Membrana plasmática lateral GO: 0016328 Membrana plasmática GO: 0005886

NOMBRE DE LA PROTEINA	ESPECIE	SÍMBOLO	GI	UNIPROT	p-valor	Proceso biológico GO_ID	Función molecular GO_ID	C. celular GO_ID
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	<i>Mus musculus</i>	RNA pol I	gi 81878711	Q8QZY1	8,34E-05	Iniciación Translacional GO:0006413 Terminación-reiniciación vía translacional GO: 007525	Actividad de iniciación del factor de translación GO:0003743	Nucleolo GO: 0005730 Centro fibrilar GO: 0001650 Nucleoplasma GO: 0005654
V-tipo protón ATPasa subunit B brain isoform	<i>Bos taurus</i>	VAT-BOVIN	gi 296484621	P31408	0,040	Procesos metabólicos de ATP GO:0046034 Transporte de H ⁺ transmembrana GO:1902600 Reducción de pH GO: 0045851	Unión a ATP GO: 0005524 Actividad de hidrolasa GO: 0016787 Actividad del transporte de H ⁺ GO:0046961	Membrana plasmática apical GO: 00016324 Membrana plasmática GO: 0005886 Citosol GO: 0005829
Tubulin alpha-3 chain	<i>Mesocricetus auratus</i>	TBA3_MESAU	gi 2025727988	P86234	2,63E-05	Proceso celular basado en microtúbulos GO:0007017	Actividad de GTPasa GO:0003924 Unión a GTP GO: 0005525	Microtúbulos GO:0005874
Tubulin alpha-2/alpha-4 chain	<i>Patella vulgata</i>	TBA2 PATVU	gi 1174593	P41383	6,65E-10	Proceso basado en microtúbulos GO: 0007017	Unión GTP GO: 0005525 Actividad de GTPasa GO:0003924	Microtúbulos GO:0005874

ESPECIE SÍMBOLO GI UNIPROT p-valor Proceso biológico Función molecular C. celular

NOMBRE DE LA PROTEINA						GO_ID	GO_ID	GO_ID
Tubulin beta-4 chain	<i>Xenopus laevis</i>	TBB4_XENLA	gi 147905746	P30883	1,99E-05	Proceso basado en microtúbulos GO:0007017 Organización del citoesqueleto GO:0007010	Constituyente estructural citoesqueleto GO: 0005200 GTP Unión GO:0005525 Actividad GTPasa GO: 0003924	Microtúbulos GO: 00 05874
Calreticulin	<i>Schistosoma mansoni</i>	CALR_SCHMA	gi 499349	Q06814	0,042	Plegamiento de Proteína GO:0006457	Unión a carbohidratos GO: 0030246 Unión a iones de Ca ²⁺ GO:0005509 Unión de proteínas no plegadas GO: 0051082	Lumen de retículo endoplasmático GO:0005788
26S protease regulatory subunit 6B	<i>Manduca sexta</i>	PRS6B_MANSE	gi 1714782021	P46507	0,0029	Procesos de catabolismo GO:00301	Unión a ATP GO:0005524 Actividad de hidrólisis de ATP GO: 0016887	Núcleo GO: 0005634
RNA helicase, ATP-dependent, DEAD-box	<i>Homo sapiens</i>	RNA helicase	gi 3023628	O00571	4,62E-05	Homeostasis lipídica GO:0055088 Respuesta inmune GO0045087 Respuesta celular a estrés osmótico GO:0071470Regulación negativa de apoptosis GO: 3023628	Unión a nucleótido GO0000166	Centrosoma GO: 0005813 Citosol GO: 0005829 Complejo NLRP3 GO: 0072559 Membrana plasmática GO: 0005886 Núcleo GO:0005634 Región extracelular GO: 0005576

NOMBRE DE LA PROTEINA	ESPECIE	SÍMBOLO	GI	UNIPROT	p-valor	Proceso biológico GO_ID	Función molecular GO_ID	C. celular GO_ID
Actin, muscle-type A1	<i>Bombyx mori</i>	ACT1_BOMMO	gi 187281814	P07836	0,0488	-----	Unión a ATP GO:0005524	Citoesqueleto GO: 0005856
Deoxyribonuclease II	<i>Bos taurus</i>	Desosx. II	gi 2921841	P00639	6,62E-06	Catabolismo del DNA GO:0006308 Respuesta inmune por activación neutrófila GO: 0002283 Regulación de respuesta inflamatoria aguda GO: 0002673	Actividad desoxirrib. GO: 0004530 Unión a DNA GO: 0003677	Núcleo GO: 0005634
Tubulin beta chain	<i>Haliotis discus</i>	TBB_HALDI	gi 1066143	P41386	0,01567	Procesos basados en microtúbulos GO: 0007017	Constituyente estructural del citoesqueleto GO: 0005200 GTP Unión GO:0005525 Actividad GTPasa GO: 0003924	Microtúbulos GO: 0005874
NUDIX hydrolase domain	<i>Glossina austeni</i>	NUDIX	gi 1829518595	A0A1A9VK88	0,01567	Procesos metabólicos de DNA GO:0006259	Unión a ATP GO:0005524 Actividad desoxi. GO: 0004536 Actividad pirofosfatasa GO: 0016462	Componente integral de membrana GO: 0016021

NOMBRE DE LA PROTEINA	ESPECIE	SÍMBOLO	GI	UNIPROT	p-valor	Proceso biológico GO_ID	Función molecular GO_ID	Compo. celular GO_ID
Actin	<i>Lumbricus rubellus</i>	ACT_LUMRU	gi 1695157	P91754	2,85E-05	----	Unión a ATP GO: 0005524 Unión a nucleótido GO: 0000166	Citoesqueleto GO: 0005856
Actin	<i>Pisaster ochraceus</i>	ACTC_PISOC	gi 160762	P12716	0,02971	----	Unión a ATP GO: 0005524 Unión a nucleótido GO: 0000166	Citoesqueleto GO: 0005856
Centromere/kinetochore protein Zw10	<i>Drosophila melanogaster</i>	Centromere	gi 11387366	Q9W4X9	0,0277	División celular GO:0051301 Ciclo meiótico GO:0051321 Organización de Golgi GO:0007030 Generación de gametos masculinos GO:00482332	Unión A GTPasa pequeñas GO:0031267	Cinetocoro GO: 0005828 Huso cromático GO: 0051233 Retículo endoplasmático GO: 0005783 Aparato de Golgi GO: 0005794 Núcleo CO: 0005634
Folypolyglutamate Synthetase, mitochondrial	<i>Mus musculus</i>	Folypolyglu	gi 1345106	P48760	0,0277	Proliferación celular GO: 0008283 Biosíntesis de compuestos con ácido fólico GO: 0009396 Metabo. de glutamato GO: 0006536 Biosíntesis del Tetrahidrofolilpoligluta GO: 00469 Regeneración del órgano animal GO:003100	Actividad de tetrahidrofolilglutamato sintetasa GO: 000432 Unión a ATP GO:0005524 Unión a iones metálicos GO:0046872	Citosol GO: 0005829 Mitochondrias GO: 0005739

NOMBRE DE LA PROTEINA	ESPECIE	SÍMBOLO	GI	UNIPROT	p-valor	Proceso biológico GO_ID	Función molecular GO_ID	Compo. celular GO_ID
Protein family UPF0126	<i>Desulfoluna butyratoxydans</i>	UPF0126	gi 1356000542	A0A4U8YW26	0,00035	-----	-----	Membrana plasmática GO: 0005886
Proteasome, alpha-subunit, conserved site	<i>Spiders Homo sapiens</i>	Proteasome	gi 23110942	P25786	0,0277	Proceso catabólico de proteínas proteasomales GO: 0010498	Unión a RNA GO: 0003723	Centrosoma GO: 0005813 Citosol GO: 0005829 Extracelular exoma GO: 0070062 Núcleo GO: 0005634 Nucleoplasma GO: 0005654
Homeobox protein Nkx-2.5	<i>Mus musculus</i>	Homeobox	gi 385750	P42582	0,0449	Procesos del Sistema inmune GO:0002376 Procesos del Sistema muscular GO:00033071 Procesos del Sistema circulatorio GO:0003013 Regulación de la transcripción de copias del DNA GO 0006355 Muerte celular programada GO: 0023052 Señalización GO:0030154 Diferenciación celular GO:0030154 Desarrollo de estructuras anatómicas GO: 0048856	Unión a DNA GO: 0003677 Acividad homodimerizada GO: 0042803	Núcleo GO: 0005634 Complejo regulador de transcripción RNA Polimerasa II GO: 0090575

NOMBRE DE LA PROTEINA	ESPECIE	SÍMBOLO	GI	UNIPROT	p-valor	Proceso biológico GO_ID	Función molecular GO_ID	Compo. celular GO_ID
Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2	<i>Homo sapiens</i>	Brefeldin	gi 150417986	Q9Y6D5	0,0053	Regulación de actividad catalítica GO: 0050790 Reciclaje del receptor GO:0001881 Transporte de Golgi a la membrana plasmática GO:0006893	Actividad del factor de intercambio guanil-nucleotido GO: 0005085 Unión a miosina GO: 0017022 Unión de la subunidad A reguladora de la proteína Kinasa GO: 0034237	Citosol GO:0005829 Aparato de Golgi GO: 0005794 Nucleolo GO: 0005730 Complejo Ribonucleoproteínico GO: 0030532
Ras small GTPase, Ras type	<i>Penicillium camemberti</i>	GTPase A	gi 902275467	A0A0G4NWW1	0,0096	Endocitosis GO: 0006897 Transporte de Golgi a la membrana plasmática GO: 0043001 Respuesta al estrés del retículo endoplasmático GO:0034976	Unión a GTP GO: 0005525 Actividad GTPasa GO: 0003924	Citosol GO: 0005829 Retículo endoplasmático GO: 0005783 Aparato de Golgi GO: 0005802
B-box type zinc finger family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Zinc finger, B-box	gi 1063727626	Q9SYM2	0,0032	Fotomorfogénesis GO: 0009640 Regulación de la transcripción, DNA copia GO: 0006355	Unión a iones de Zn GO: 0008270 Unión a iones metálicos GO: 0046872	Núcleo GO: 0005634

NOMBRE DE LA PROTEINA	ESPECIE	SÍMBOLO	GI	UNIPROT	p-valor	Proceso biológico GO_ID	Función molecular GO_ID	Compo. celular GO_ID
Putative ankyrin repeat protein R863	<i>Acanthamoeba polyphaga mimivirus</i>	YR863 MIMIV	gi 82019384	Q5UQJ2	0,00054	----	----	----
7TM GPCR, rhodopsin-like	<i>Nematodes</i>	GPCR_Rhodpsn	gi 1376153056	A0A5E4NSC3	0,005336	----	----	Componente integral de membrana GO: 0016021
2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	<i>Methylibium petroleiphilum</i>	GPMA_METPP	gi 166991331	A2SDN6	0,00541	Glucogenogénesis GO: 0006094 Procesos glicolíticos GO: 0006096	Actividad de mutasa fosfoglicerato GO: 0046538	----
Peptidase C1A, papain C-terminal	<i>Cinara cedri</i>	Peptidase C1A	gi 1743609628	A0A5E4M6W7	0,00533	Proteolisis GO: 0006508	Actividad peptidasa tipo cisteína GO: 0008234	----
CUB domain	<i>Cinara cedri</i>	CUB	gi 1743595178	A0A5E4N6Y1	0,00013			Componente integral de membrana GO: 0016021
Eukaryotic translation initiation factor 4E binding	<i>Homo sapiens</i>	initiation factor 4E	gi 1352435	P06730	0,00035	Transición G1/S del ciclo celular miótico GO: 0000082 Regulación positiva del ciclo miótico GO: 0045931 Regulación de translación GO: 0006417	Unión a DNA GO: 0140297 Unión enzimas GO: 0019899 Unión al 4G GO: 0031370 Unión a RNA GO: 0003723 Act. itranslación GO: 0003743	Citosol GO: 0005829 Extracelular exoma GO: 0070062 Núcleo GO: 0005634

En la Figura 25A se presentan los procesos biológicos más representativos de las proteínas identificadas y que se distribuyeron en los siguientes porcentajes: procesos celulares con un 25%, seguidos de respuesta a estímulos y metabolismo con un 14%, y por último la regulación y el transporte con un 8%.

En relación con la función molecular (Figura 25 B), las proteínas estuvieron principalmente relacionadas con la actividad catalítica (37%) y la unión (24%), seguida por la actividad de un transportador (3%). En cuanto a los componentes celulares (Figura 25 C), las proteínas se asociaron principalmente con citoplasma (22%), regiones anatómicas celulares (22%), membrana (14%) y orgánulo (8%).

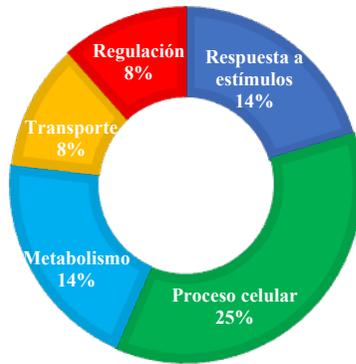
La mayoría de las 35 proteínas identificadas (ver tabla 19) presentaron una ratio de expresión entre 1-0,5, y agrupándose en 4 clases de proteínas principales como son: las proteínas estructurales (ej. actina, espectrina, y tubulina), las proteínas de respuesta al estrés térmico (ej. heat shock proteins: HSP90, HSP83), las proteínas de transporte iónico (ej. V-tipo protón ATPasa) y las proteínas de metabolismo (ej. proteosoma, tiolasa).

A nivel de abundancia, las proteínas de las poblaciones de este trabajo coinciden mayoritariamente con los estudios previos de transcriptómica realizados en las mismas poblaciones por Navarro et al. (2013). Comparando los porcentajes de cada proteína implicados en los procesos biológicos obtenidos en el presente trabajo con los valores obtenidos por Navarro et al. (2013), observamos una semejanza en los procesos biológicos más importantes en relación con: la regulación, la señalización, el metabolismo, el desarrollo, la respuesta a estímulos; y con las funciones moleculares más significativas como: la catálisis, la translación, la transcripción y la unión a metales.

Dado que el porcentaje de proteínas relacionadas con la reproducción es pequeño, podríamos interpretar que los organismos podrían estar expuestos a estrés ambiental, y aquellas poblaciones localizadas en zonas con un mayor nivel de Hg y Cd (ej. Flix(FF, FR y Riba roja (RR) podrían presentar menor madurez de gónadas, siendo su estatus reproductivo inferior a las poblaciones de CAS1 FAY y SIT, donde no hay exposición a estos metales tóxicos.

PROCESOS BIOLÓGICOS

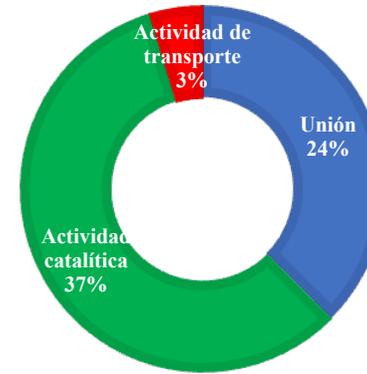
35 proteínas en total



A

FUNCIÓN MOLECULAR

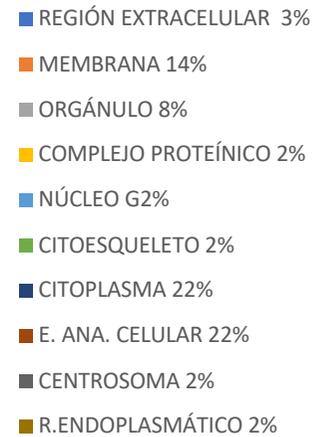
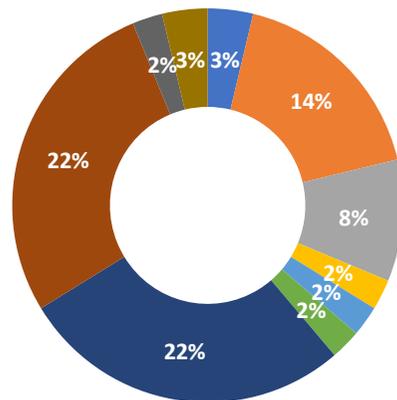
35 proteínas en total



B

COMPONENTE CELULAR

35 proteínas en total



C

Figura 25. Representación de: (A) procesos biológicos, (B) función molecular y (C) componente celular de las 35 proteínas identificadas en branquia de *D. polymorpha*.

Resultados obtenidos con ITRAQ

A través del etiquetado isobárico ITRAQ se realizó un estudio proteómico semicuantitativo de las mismas muestras de mejillón cebra, identificándose 79 proteínas que se agruparon en 5 clústeres diferentes según el patrón de expresión (Figura 26).

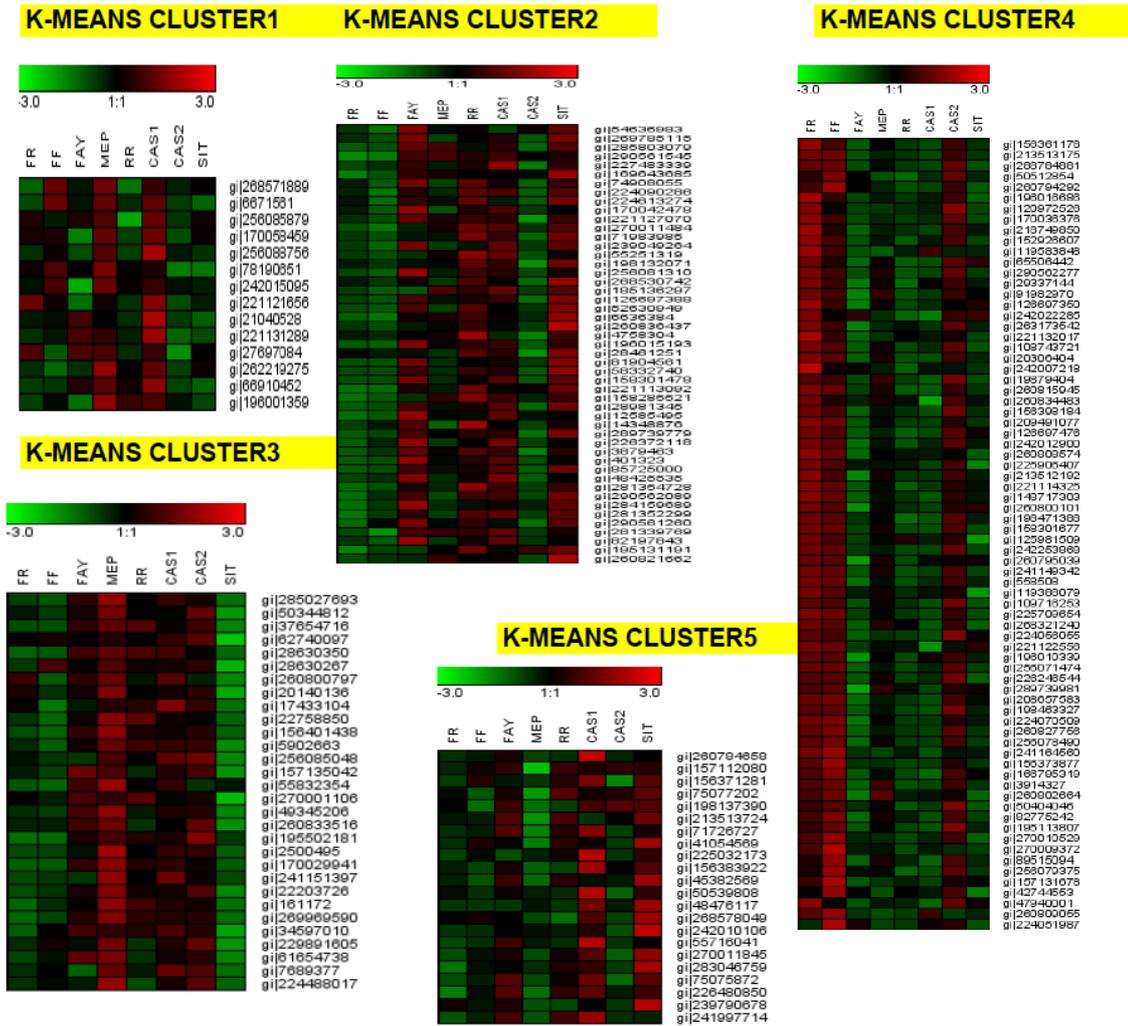


Figura 26. Gráfico de calor o “heatmap” de distribución de las proteínas con cambios significativos en la abundancia en branquias de *D. polymorpha* en las diferentes poblaciones estudiadas. El color verde indica las proteínas con menor abundancia, en rojo las de mayor abundancia y en negro sin cambios.

En cada uno de los 5 clústeres se agrupan las proteínas que presentan el mismo patrón de expresión dentro de cada población. Las proteínas del clúster 1 están más sobreexpresadas en las poblaciones de MEP (= MEQ, Mequinenza) y CAS1, y menos expresadas en las poblaciones de FAY, RR, CAS2 y SIT. En el clúster 2, las proteínas de las poblaciones de FF, FR y CAS2 tienen menor expresión que las de FAY, RR y SIT.

Observamos en el clúster 3 que las proteínas presentan menores niveles de expresión en las poblaciones de FF, FR y SIT, mientras que en MEP, CAS1 y CAS2 están más sobreexpresadas. En el clúster número 4 la mayoría de las proteínas de las poblaciones de FF, FR y CAS2 presentan mayores niveles de expresión que las del resto de poblaciones. Por último, en el grupo 5 las proteínas presentan mayor expresión en CAS1 y SIT y menor abundancia en FF, FR, MEP y CAS2.

Entre las proteínas que de acuerdo con esta metodología (ITRAQ) presentan diferencias en expresión entre poblaciones, hay algunas de ellas que coinciden con los valores de abundancia encontrados mediante la metodología DIGE. Entre las proteínas que coinciden en ambas metodologías se encuentran: V-type-H⁺-ATPasa, el factor de elongación 1-alfa, el factor 3 de iniciación de la traducción eucariótica y la beta- tubulina.

La proteína V-type-H⁺-ATPasa, presente en clúster 1 con gi |21040528 (ATPase, H⁺ transporting, lisosomal 56/58kDa), y en clúster 2 con gi |401323 (V-tipo protón ATPasa catalytic subunit A) y gi |12585495 (V-tipo protón ATPasa subunit E), muestra un mayor valor de abundancia en CAS1 y FAY y valores inferiores en CAS2 y SIT. Estos resultados son coincidentes con lo encontrado mediante el método DIGE (Figura 24). En el clúster 2 encontramos el factor de elongación 1-alfa, con gi |290561545, y en el clúster 3, el factor 3 de iniciación de la traducción eucariótica, con gi |224488017, muestran mayor abundancia en la población de MEP y menor en SIT.

La proteína beta-tubulina, en el clúster 4 con un gi |91982970, se expresa con mayor abundancia en la población de FR y menor en la población de FAY, coincidiendo con los valores obtenidos con la metodología DIGE (Figura 24). De forma similar la actina, en cluster 5 con gi |45382569, tiene mayores valores de abundancia en FF y menores en FAY coincidiendo con los datos de DIGE (Figura 24). También encontramos la proteína proteosoma en el clúster 5, gi |157112080, con un valor medio menor de abundancia en la población de MEP coincidiendo con los valores observados en la metodología DIGE (Figura 24)

Las variaciones en abundancia de las proteínas identificadas en las diferentes poblaciones estudiadas e implicadas en procesos biológicos relevantes se presentan en las figuras 27-31.

Formación del citoesqueleto

Actina, Espectrina, Tubulina.

La actina y la tubulina son las responsables de la generación de contracción en el músculo de bivalvos (Grøsvik et al., 2006). La proteína actina combinada con microtúbulos (formados por polimerización de alfa-tubulina) representa el componente fundamental del citoesqueleto (Rodríguez-Ortega et al., 2003; Apraiz et al., 2006). En las células eucariotas, los filamentos de actina interactúan con la proteína miosina, siendo la base de la contracción muscular, motilidad, transporte intracelular, división y diferenciación celular (Herman y Scholten, 1990).

Las poblaciones de Flix (FF y FR) y Mequinenza (MEQ) presentan mayor abundancia de actina (Figura 27A). En la localidad de Flix fábrica (FR) existe un alto contenido en Cd, este metal tóxico puede generar estrés oxidativo e inducir una alteración en la actina provocando una desorganización en el citoesqueleto (Gómez-Mendikute y Cajaraville, 2003; Rodríguez-Ortega et al., 2003). Por otra parte, el Cd puede unirse a la actina promoviendo desnaturalización o bien puede interactuar indirectamente con los grupos sulfhidrúlicos de algunas proteínas provocando una disrupción en la homeostasis del Ca^{2+} a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Asharani et al., 2009). En la población de MEQ existe un alto nivel de Cu^{2+} si la comparamos con el resto de las poblaciones estudiadas. En estudios realizados en *Artemia sínica* (Zhou et al., 2009) se observa que bajo condiciones de estrés por alta concentración de Cu^{2+} se produce una regulación al alza de actina. Altos niveles de cobre inducen un aumento de producción de ROS causantes de daño celular (Yu y Chai, 1995; Uriu-Adams et al., 2005).

Las poblaciones de Fayón (FAY) y Sitjar (SIT) tienen menor abundancia de actina que el resto de las localidades de estudio. En el caso de SIT, como hemos visto en el apartado 3.1.2 del presente trabajo, sus branquias tenían el nivel más alto de Pb de todas las poblaciones. El estrés producido por este metal tóxico puede actuar en la modulación de la actividad de actina como respuesta al estrés oxidativo según estudios proteómicos realizados en ostras por (Muralidharan et al., 2012).

La espectrina junto con otras proteínas laminares forma el núcleo del citoesqueleto (Lambert et al., 2019), encargándose de la reparación de las cadenas de DNA cuándo haya daño celular. Esta proteína es vital para la formación de fosfolípidos, el contacto epitelial célula-célula y la formación de la membrana lateral de las células apicales. La población de SIT tiene mayor abundancia relativa de espectrina (Figura 27B). La población de SIT que muestra mayor valor

de Pb que el resto de las poblaciones de estudio, y la posible alteración de espectrina debida a la inducción de especies reactivas de oxígeno que inducen daño celular.

Coincidiendo con el presente trabajo otros autores (Navarro et al., 2013) encuentran valores de Zn elevados en la localidad de SIT en ejemplares recogidos en 2009, así como altos niveles de PAH. En SIT la temperatura media es ligeramente superior al resto de poblaciones a lo largo del año y especialmente en verano, apartado 3.1.1 del presente trabajo. Algunos estudios (Dowd et al., 2013) relacionan el impacto de la temperatura con una mayor abundancia de algunas proteínas citoesqueléticas y con la actividad de enzimas asociadas al ATP para la producción de defensas antioxidantes.

La tubulina (Figura 27C) es el principal componente de los microtúbulos responsable del transporte intracelular, la unión y regulación de la forma fisiológica de la célula (Stekhoven et al., 2015). Otras funciones son la estimulación del ciclo reproductivo, maduración de gametos y liberación de células germinales (Yurchenko et al., 2022).

En la población de Flix fábrica (FF) la abundancia de esta proteína es mayor que en el resto de las poblaciones coincidiendo con el alto nivel de Hg y Cd encontrado (ver apartado 3.1.2 del presente trabajo). En estudios previos realizados en *Dyctiotelium discoideum* con exposición a Hg²⁺ (Marsano et al., 2009), han obtenido valores de abundancia mayores en proteínas relacionadas con la defensa celular, señalización y estabilidad de membrana plasmática. Estos cambios cuantitativos son debidos a que Hg²⁺ puede desestabilizar la membrana lisosomal debido a un incremento en la concentración de Ca²⁺ citosólica que daría lugar a una disrupción en la homeostasis del calcio. En la población de Fayón (FAY) hay menos abundancia de tubulina, quizás debido a unos bajos niveles de estrés químico encontrados.

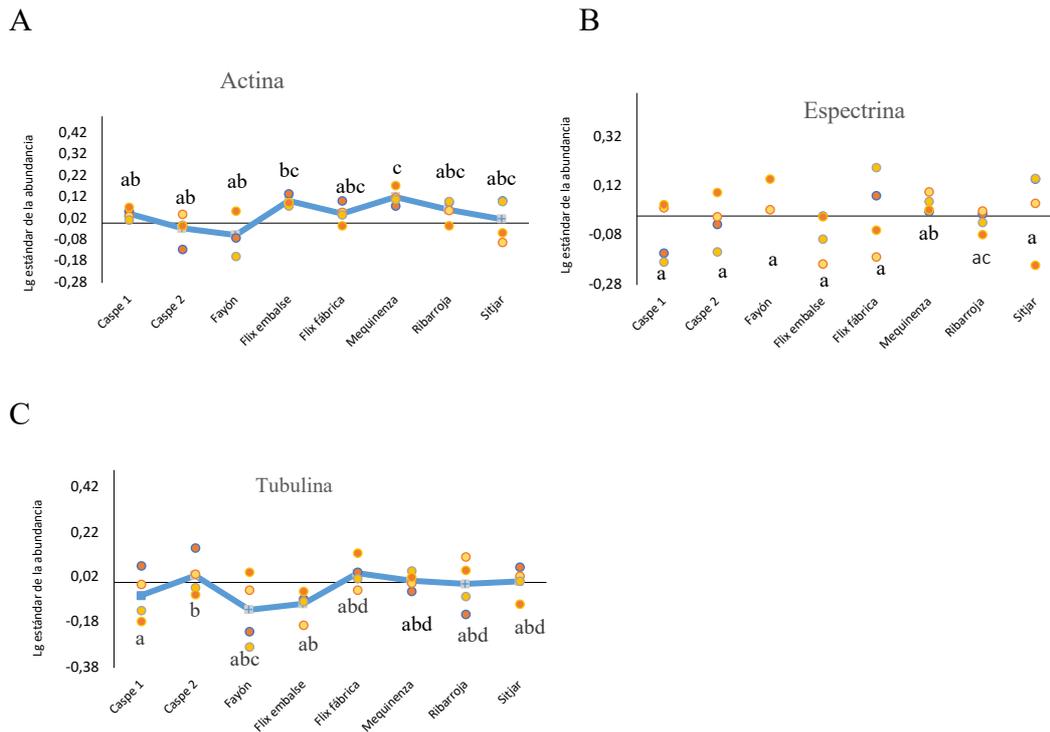


Figura 27. Lg estándar de la abundancia de: (A) Actina, (B) Espectrina, (C) Tubulina en branquia de *D. polymorpha* en las diferentes poblaciones de estudio. Las poblaciones con diferentes letras presentan diferencias significativas para $p < 0,05$.

Proteínas de estrés térmico HSP90, HSP83, HSP90b

En el presente trabajo se han encontrado diferencias significativas ($p < 0,05$) entre poblaciones en las proteínas de estrés HSP83, HSP90 y HSP90beta (Figura 28). Estas proteínas pertenecen a la familia de las chaperonas (HSPs) que están involucradas en numerosas actividades celulares como el plegamiento de proteínas, el control del ciclo celular, la señalización, el transporte y la protección contra apoptosis. Son inducidas por diversos factores de estrés como la temperatura, metales pesados y disolventes orgánicos, entre otros (Leiers et al., 2013).

En la Figura 28C se observa mayor abundancia de HSP90b en la población SIT y RB. Tal como hemos comentado en el apartado 3.1.1 de este estudio, la temperatura en esta localidad es ligeramente superior que en el resto de las poblaciones, pudiendo ser un factor para el aumento de esta chaperona por estrés térmico. Otros autores (Fields et al., 2020) en estudios realizados en ejemplares de mejillón rayado (*Geukensia demissa*), han observado un incremento significativo de esta proteína con el aumento de temperatura. Además en SIT se ha obtenido el valor más alto

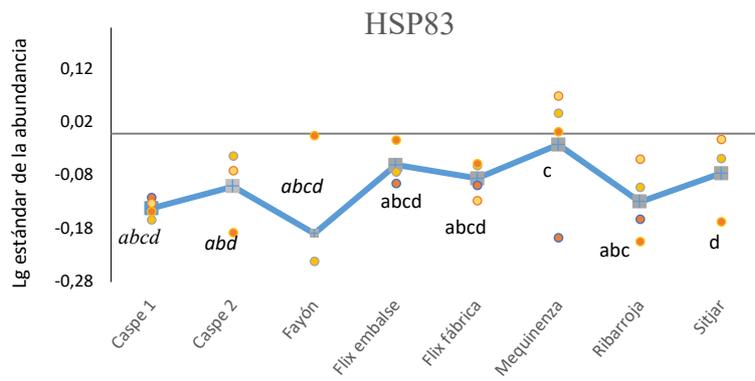
de Pb en los tejidos de mejillón cebra. Este metal tóxico al igual que otros cationes divalentes como Cd^{2+} o Cu^{2+} provoca estrés oxidativo en moluscos bivalvos como *M. edulis* (Kim et al., 2007; Piechnik et al., 2017), lo que podría explicar el aumento encontrado en HSP90b para la población de SIT.

La población de FR presenta mayor abundancia media en la proteína HSP90b (Figura 28B). Al igual que en las otras chaperonas, se observa que su abundancia es mayor en las poblaciones dónde se han encontrado niveles elevados de metales como Cd y Hg. En otros organismos, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se ha visto una regulación al alza de estas proteínas como consecuencia de la exposición a los metales Cd y Hg (Leiers et al., 2013).

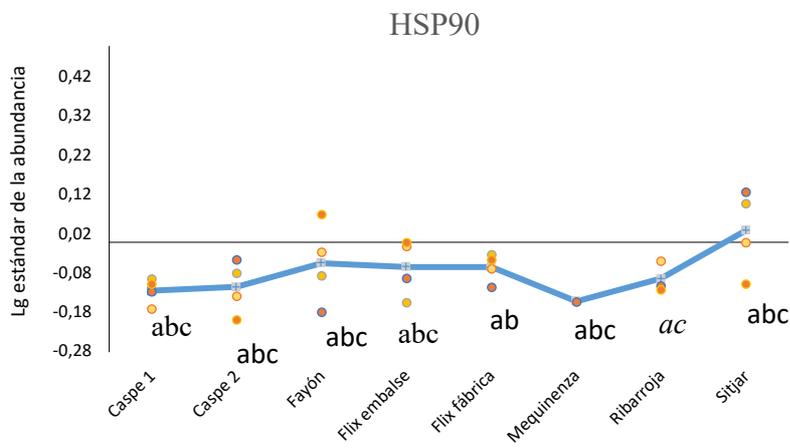
En la proteína HSP83 (Figura 28A) observamos que la población de MEQ presenta mayor abundancia media. En el apartado 3.1.2 del presente trabajo se determinó que MEQ es la segunda población con mayores valores de Pb en sus tejidos. Estudios previos en oreja de mar, *Haliotis discus hannai*, encontraron un incremento en HSP83 al ser expuestos a una elevada concentración de nitrato de Pb (Sun y Hu, 2016).

Las poblaciones de CAS1, FAY y MEQ presentaron en general una menor abundancia de proteínas de estrés que las del resto de las localidades de estudio, posiblemente debido a unos niveles bajos de estrés por metales tóxicos.

A



B



C

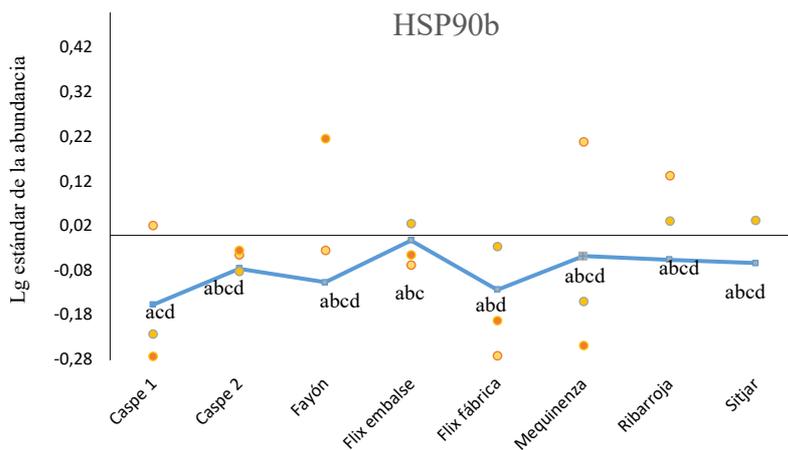


Figura 28. Lg estándar de la abundancia de las proteínas de estrés térmico: (A) HSP83, (B) HSP90 y (C) HSP90b en branquia de *D. polymorpha* en las diferentes poblaciones de estudio. Las poblaciones con diferentes letras presentan diferencias significativas para $p < 0,05$.

Transporte iónico

V-tipo protón ATPasa

En la mayor parte de los organismos eucariotas la proteína V-tipo protón ATPasa (Figura 29), podemos encontrarla en las vacuolas y en el núcleo mitocondrial. Una proteína altamente conservada posee funciones como la acidificación de orgánulos intracelulares a través del funcionamiento de la bomba de protones, tráfico de partículas por endo y exocitosis a través de la membrana celular e interacción con el citoesqueleto (Weihrach et al., 2002).

Para la V-tipo protón ATPasa, se observa que los ejemplares de mejillón cebra de Caspe puente (CAS1) presentan la mayor abundancia (Figura 29), coincidiendo con un elevado nivel de Cu^{2+} en esa localidad (ver apartado 3.1.2 del presente trabajo). En elevadas concentraciones este metal esencial se convierte en un potente tóxico generando de forma rápida especies reactivas de oxígeno (ROS) que promueven la sobreexpresión de las proteínas involucradas en la actividad del sistema lisosomal, y de transporte iónico (Grosell et al., 2012).

Por otro lado, los ejemplares de la localidad de SIT tienen menor abundancia de esta proteína. Como ya se ha mencionado anteriormente (apartado 3.1.2 de este estudio) es la población con mayores niveles de Pb. En estudios realizados en branquias de *M. galloprovincialis* se ha observado que la respuesta de proteínas involucradas en el transporte iónico (V-tipo protón ATPasa) está débilmente relacionada con el metabolismo oxidativo producido por metales tóxicos (Rocher et al., 2015). Este estudio podría explicar la regulación a la baja de esta proteína en presencia de Pb.

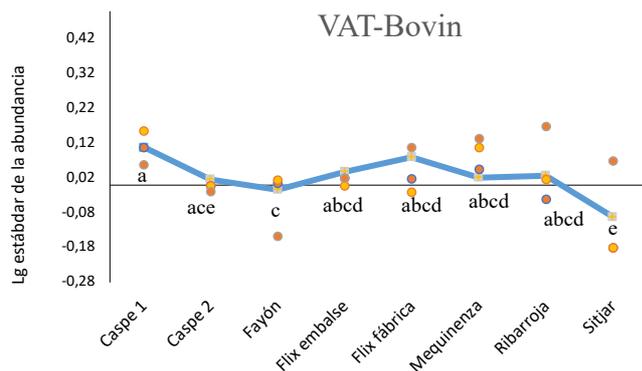


Figura 29. Lg estándar de la abundancia de V-tipo protón ATPasa (símbolo VAT Bovin) en branquia de *D. polymorpha* en las diferentes poblaciones de estudio. Las poblaciones con diferentes letras presentan diferencias significativas para $p < 0,05$.

Oxidación de ácidos grasos

Tiolasa

La proteína tiolasa (Figura 30) es una enzima abundante en todos los organismos encontrándose como componente de citoesqueleto y de músculo, y está involucrada en la β -oxidación de ácidos grasos en la matriz mitocondrial y peroxisomas (Del Toro et al., 2012).

La población con menor abundancia de proteína tiolasa es la de Flix fábrica (FF), dónde se ha encontrado el valor más alto de Hg y Cd (ver apartado 3.1.1 del presente estudio) y de PAH, PCBs y otros compuestos organoclorados (Navarro et al., 2013). Sin embargo, en el resto de las localidades estudiadas podemos observar que los valores de abundancia en las branquias son homogéneos.

Otros autores han estudiado el perfil de expresión génica en ejemplares de *M. galloprovinciales* cuando se exponen a diferentes PAH (Bilbao et al., 2009). Los resultados obtenidos para la proteína tiolasa indicaron que su expresión no se vio afectada por la exposición a compuestos organoclorados. Coincidiendo con los resultados de Bilbao et al. (2010), en el presente trabajo vemos como el exceso de Hg y PAH no afectan significativamente a la variación en la abundancia media de la tiolasa.

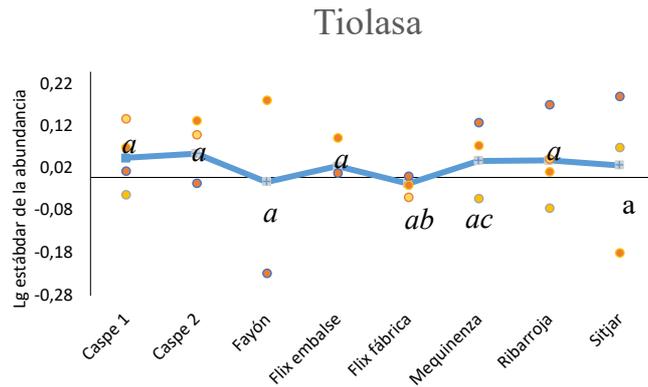


Figura 30. Lg estándar de la abundancia de tiolasa en branquia de *D. polymorpha* en las diferentes poblaciones de estudio. Las poblaciones con diferentes letras presentan diferencias significativas para $p < 0,05$.

Catálisis

Proteasoma

El proteasoma o proteasoma, es un complejo multiproteico grande y altamente conservado en células eucariotas, y cuya función principal es la degradación enzimática (proteólisis) de proteínas no necesarias o dañadas (Iwasa et al., 2020). Esta proteína está involucrada en mecanismos esenciales como el ciclo celular, la regulación de la expresión génica y la respuesta al estrés oxidativo.

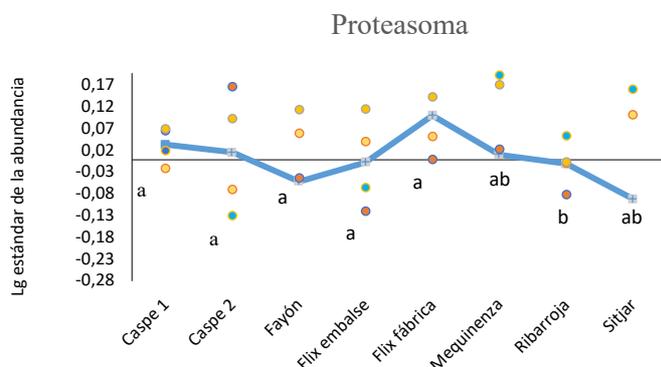


Figura 31. Lg estándar de la abundancia de Proteasoma en branquia de *D. polymorpha* en las diferentes poblaciones de estudio. Las poblaciones con diferentes letras presentan diferencias significativas para $p < 0,05$.

La población de FF es la que presenta mayor abundancia de proteosoma (Figura 31). Como ya se ha mencionado en el apartado 3.1.2 del presente trabajo, esta población tiene valores altos de Hg y Cd, además de PAH (Navarro et al., 2013), PCBs y HCH (Bosch et al., 2009). Esta mezcla de contaminantes podría inducir estrés oxidativo en el mejillón cebra. En estudios realizados en ejemplares de *salmón (Oncorhynchus mykiss)* expuestos a una mezcla de PAHs, disolventes y retardantes de llama, obtuvieron una regulación al alza en los valores de abundancia en proteosoma (Carney et al., 2008).

4. CONCLUSIONES GENERALES

4. Conclusiones generales

1. En las poblaciones corriente arriba del río Ebro (desde Flix hacia el alto Aragón): CAS 1, MEQ y CAS 2 presentan mejor condición fisiológica determinada a través del índice de contenido hídrico (DWI). Además, los mejillones de dichas localidades presentan valores de metales bajos en sus tejidos. En las localidades corriente abajo (desde Flix hacia la desembocadura del río Ebro): FF, FR, RR observamos valores altos de metales tóxicos como Cd, Hg y Pb en sus tejidos. Con respecto a la población de SIT, (embalse de Sitjar, río Mijares) podemos decir que su DWI es similar que el de las localidades del Ebro más afectadas por metales tóxicos pudiendo estar relacionado con las altas concentraciones de Pb encontradas en los tejidos.

2. Se ha observado que la glándula digestiva es el tejido preferencial de síntesis de MT en todas las poblaciones estudiadas presentando valores hasta cuatro veces mayor que en branquia. Se encuentra una relación diferente entre metales y MT en glándula digestiva y branquia, así como una variabilidad estacional y entre poblaciones.

3. Se encontró que los niveles de cobre (Cu) en los dos tejidos eran bastante uniformes entre todas las poblaciones de estudio en otoño y lo mismo ocurría con el zinc en la glándula digestiva en primavera, de acuerdo con la existencia de mecanismos reguladores para los metales esenciales en esta especie. Sin embargo, el contenido de Cu en la glándula digestiva en primavera y el de Zn en ambos tejidos en otoño presentaron diferencias entre poblaciones.

4. El análisis proteómico de las branquias de las diferentes poblaciones de mejillón cebrá, mediante la tecnología DIGE e ITRAQ, permite obtener patrones de expresión en su abundancia que se pueden asociar a la contaminación de sus hábitats. Las poblaciones localizadas en zonas con menor contaminación por metales tóxicos, como Fayón y Sitjar, presentan menor expresión en abundancia de proteínas en comparación con las poblaciones de Flix situadas en zonas más contaminadas.

5. La mayoría de las proteínas identificadas están implicadas en procesos biológicos estructurales (actina, espectrina, tubulina), de respuesta al estrés (HSP90, HSP83), en el transporte iónico (V-tipo protón ATPasa) y en el metabolismo (proteosoma, tiolasa); y cuya variación en su abundancia en las diferentes poblaciones, se puede asociar a los niveles de contaminación por metales tóxicos.

6. Las proteínas estructurales, al igual que el proteasoma presentan mayor abundancia en las poblaciones de Flix y Riba-roja donde los niveles de Cd y Hg son mayores. Mientras que las proteínas de estrés muestran menor abundancia en las poblaciones de Caspe, Fayón o Mequinenza, donde los niveles de metales tóxicos son menores. Sin embargo, las variaciones de la tiolasa no se ven afectadas por la presencia de metales tóxicos.

En conjunto, A través del análisis e interpretación de los valores de la concentración de metales, del índice de contenido hídrico (DWI), del contenido en metalotioneína (MT), el contenido en fósforo (P), la actividad de Na^+, K^+ -ATPasa y la expresión proteica se ha podido establecer diferencias significativas entre las diferentes poblaciones de mejillón cebra objeto de estudio en los ríos Ebro y Mijares.

5. BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFÍA

Aksu, O., Gulec, A.K., Demir, V., Danabas, D., Yildirim, N., Ozcelik, M., Can, E., Kocabas, M., 2013. Bioaccumulation of copper and zinc in freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus*) fed with zebra mussels (*D. polymorpha*) collected from keban dam lake, turkey. Asian J. Chem. 25, 5476-5478.

Aksu, O., Yabanli, M., Can, E., Kutluyer, F., Kehayias, G., Can, S.S., Kocabas, M., Demir, V., 2012. Comparison of heavy metals bioaccumulation by *D. polymorpha* (Pallas, 1771) and unio *Elongatulus eucirrus* (Bourguignat, 1860) from keban dam lake, turkey. Fresenius Environ. Bull. 21, 1942-1947.

Alcaraz, C., Caiola, N., Ibáñez, C. 2011. Bioacumulation of pollutants in the zebra mussel from hazardous industrial waste and evaluation of spatial distribution using GAMs. Sci. Total Environ. 409, 898-904

Alix, M., Knight, R.J. Ormerod S.J., 2016. Rapid colonisation of a newly formed lake by zebra mussels and factors affecting juvenile settlement. Manag Biol Invasion (2016) Volume 7, Issue 4: 405–418

Asharani, PV., Gong, Y., Valiyaveettil, S., 2009. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish. Nanotoxicology. 5(1):43-54

Apraiz I, Mi J, Cristobal S., 2006 Identification of proteomic signatures of exposure to marine pollutants in mussels (*Mytilus edulis*). Mol. Cell Proteomics 5:1274–1285.

Araujo, R. La afección del mejillón cebra y su posible lucha en las infraestructuras, especialmente en los riegos tradicionales y modernizados del Levante Ibérico. 2022

https://www.chj.es/es-es/medioambiente/mejilloncebra/Documents/Enlaces%20y%20Material%20de%20interés/5188_Informe_Araujo_Riegos_Ed2.pdf. Acceso Octubre 2022.

- Bacchetta, R., y Mantecca, P. 2009. DDT polluted meltwater affects reproduction in the mussel *D. polymorpha*. *Chemosphere*, 76(10), 1380-1385.
- Baker SM, Levinton JS, Ward JE. 2000. Particle transport in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Biol Bull.* 199(2).116-25.
- Bebianno, M.J. 1989. Quantification of metallothioneins in marine invertebrate using differential pulse polarography. *Port. Electrochim. Acta* 7: 59–64
- Bebianno, M.J., Gonzalez-Rey, M., Gomes, T., Mattos, J.J., Flores-Nunes, F., Bainy, A.C.D., 2015. Is gene transcription in mussel gills altered after exposure to ag nanoparticles? *Environ. Sci. Pollut. Res.*22, 17425-17433.
- Bebianno, M.J., Sroda, S., Gomes, T., Chan, P., Bonnafe, E., Budzinski, H., Geret, F., 2016. Proteomic changes in *Corbicula fluminea* exposed to wastewater from a psychiatric hospital. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 5046-5055.
- Beijer, D., Deconinck, T., De Bleecker, J.L., Dotti, M.T., Malandrini, A., Urtizbera, J.A., Zulaica, M., Lopez de Munain, A., Asselbergh, B., De Jonghe, P., Baets, J., 2019. Nonsense mutations in alpha-II spectrin in three families with juvenile onset hereditary motor neuropathy. *Brain* 142, 2605-2616.
- Benelli, S., Bartoli, M., Zilius, M., Vybernaite-Lubiene, I., Ruginis, T., Vaiciute, D., Petkuvienė, J., Fano, E.A., 2019. Stoichiometry of regenerated nutrients differs between native and invasive freshwater mussels with implications for algal growth. *Freshwat. Biol.* 64, 619-631.
- Benito, M., Mosteo, R., Rubio, E., LaPlante, D., Ormad, M.P., Goñi, P., 2017. Bioaccumulation of inorganic elements in *D. polymorpha* from the Ebro River, Spain: Could zebra mussels be used as a bioindicator of the impact of human activities? *River Res. Appl.* 33, 718-728.
- Bervoets L., Voets J., Covaci A., Chu S., Qadah D., Smolders R., Schepens P., Blust R. 2005. Use of transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) to assess the bioavailability of microcontaminants in flemish surface waters. *Environ. Sci. Technol.* 39 (6), 1492 - 1505,

- Bilbao, E., Cajaraville, M.P., Cancio, I., 2010. Differential transcription of genes involved in peroxisome proliferation in thicklip grey mullets *Chelon labrosus* injected with benzo(a)pyrene. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 151, 334-342.
- Bilbao, E., Cajaraville, M.P., Cancio, I., 2009. Cloning and expression pattern of peroxisomal beta-oxidation genes palmitoyl-CoA oxidase, multifunctional protein and 3-ketoacyl-CoA thiolase in mussel *Mytilus galloprovincialis* and thicklip grey mullet *Chelon labrosus*. *Gene* 443, 132-142.
- Binimelis, R., Monterroso, I., & Rodríguez-Labajos, B. 2007. A social analysis of the bioinvasions of *D. polymorpha* in Spain and *Hydrilla verticillata* in Guatemala. *Environ. Mana.*, 40(4), 555-566.
- Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Provini, A., 2010. Multi-biomarker approach to investigate the state of contamination of the R. lambro/R. Po confluence (Italy) by zebra mussel (*D. polymorpha*). *Chemosphere* 79, 518-528.
- Binelli, A., Marisa, I., Fedorova, M., Hoffmann, R., Riva, C., 2013. First evidence of protein profile alteration due to the main cocaine metabolite (benzoylecgonine) in a freshwater biological model. *Aquat. Toxicol.* 140, 268-278.
- Binelli, A., Parolini, M., Cogni, D., Pedriali, A., Provini, A., 2009. A multi-biomarker assessment of the impact of the antibacterial trimethoprim on the non-target organism zebra mussel (*D. polymorpha*). *Comp. Biochem. Physiol C-Toxicology & Pharmacol.* 150, 329-336.
- Bosch, C., Olivares, A., Faria, M., Navas, J.M., del Olmo, I., Grimalt, J.O., Pina, B., Barata, C., 2009. Identification of water soluble and particle bound compounds causing sublethal toxic effects. A field study on sediments affected by a chlor-alkali industry. *Aquat. Toxicol.* 94, 16-27.
- Bourgeault, A., Gourlay-France, C., Ayrault, S., Tusseau-Vuillemin, M.-., 2012. Bioaccumulation of waterborne ni in *D. polymorpha*: A stable isotope experiment to assess the effect of zinc, calcium, and dissolved organic matter. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 819-827.

- Bourgeault, A., Gourlay-France, C., Tusseau-Vuillemin, M., 2010. Modeling the effect of water chemistry on the bioaccumulation of waterborne cadmium in zebra mussels. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2182-2189.
- Bourgeault, A., Gourlay-France, C., Priadi, C., Ayrault, S., Tusseau-Vuillemin, M., 2011. Bioavailability of particulate metal to zebra mussels: Biodynamic modelling shows that assimilation efficiencies are site-specific. *Environ. Pollut.* 159, 3381-3389.
- Bouskill, N.J., Handy, R.D., Ford, T.E., Galloway, T.S. 2006. Differentiating copper and arsenic toxicity using biochemical biomarkers in *Asellus aquaticus* and *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 65(3) 342-9.
- Bultelle, F., Panchout, M., Leboulenger, F., Danger, J.M., 2002. Identification of differentially expressed genes in *D. polymorpha* exposed to contaminants. *Mar. Environ. Res.* 54, 385-389.
- Burgos-Aceves, M.A. and Faggio, C., 2017. An approach to the study of the immunity functions of bivalve haemocytes: *Physiol. Mol. asp. Fish Shellfish Immunol.* 67, 513-517.
- CABI, 2022. *Dreissena polymorpha*. In: *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK: CAB International. www.cabi.org/isc
- Calderón-González KG, Valero Rustarazo ML, Labra-Barrios ML, Bazán-Méndez CI, Tavera-Tapia A, Herrera-Aguirre ME, Sánchez del Pino MM, Gallegos-Pérez JL, González-Márquez H, Hernández-Hernández JM, León-Ávila G, Rodríguez-Cuevas S, Guisá-Hohenstein F, Luna-Arias JP. 2015. Determination of the protein expression profiles of breast cancer cell lines by quantitative proteomics using iTRAQ labelling and tandem mass spectrometry. *J Proteomics.* Jun 21; 124:50-78. doi: 10.1016/j.jprot.2015.04.018. Epub 2015 Apr 24. Erratum in: *J Proteomics.* 2015 Aug 3;126:312. PMID: 25918110.
- Campos, B., Rivetti, C., Tauler, R., Pina, B., Barata, C., 2019. Tryptophan hydroxylase (TRH) loss of function mutations in *Daphnia* deregulated growth, energetic, serotonergic and arachidonic acid metabolic signalling pathways. *Sci. Rep.* 9, 3693.

- Campos, B., Fletcher, D., Pina, B., Tauler, R., Barata, C., 2018. Differential gene transcription across the life cycle in *Daphnia magna* using a new all genome custom-made microarray. *BMC Genomics* 19, 370..
- Connell, D., Lam, P., Richardson, B., & Wu, R. 1999. *Introduction to Ecotoxicology* (71 p.). Oxford: Blackwell Sci. Ltd.
- Dietz, T.H. and Findley, A.M., 1980. Ion-stimulated ATPase activity and NaCl uptake in the gills of fresh-water mussels. *Canadian J. Zool.* 58, 917-923.
- Dietz, Thomas H., et al. 1996. Osmotic and ionic regulation of North American zebra mussels (*D. polymorpha*). *American Zoologist*, vol. 36, no 3, p. 364-372
- Durán, C., Banha, F., Gimeno, I., Lanao, M., Peribáñez, MA., Anastácio, PM., 2015. The role of waterfowl and fishing gear on zebra mussel larvae dispersal. *Biol. Invasions* 18:115–125.
- Durán, C., Ibáñez, C., Alcaraz, C., Caiola, N., Trobajo, R., Alonso, M., Jiménez, J., Munné, A., Prat, Narcís., 2012., Regime shift from phytoplankton to macrophyte dominance in a large river: Top-down versus bottom-up effects. *Sci. Total. Environ.* 416, 314-322.
- Engelken, J., Hildebrandt, A. 1999. cDNA cloning and cadmium-induced expression of metallothionein mRNA in zebra mussels *D. polymorpha*. *Biochem. Cell Biol.* 77 (3) 237-241.
- Faria, M., Angel Lopez, M., Diez, S., Barata, C., 2010. Are native naiads more tolerant to pollution than exotic freshwater bivalve species? An hypothesis tested using physiological responses of three species transplanted to mercury contaminated sites in the Ebro River (NE, Spain). *Chemosphere* 81, 1218-1226.
- Faria, M., Navarro, A., Luckenbach, T., Pina, B., Barata, C., 2011. Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel (*D. polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants. *Aquat. Toxicol.* 101, 78-87.
- Faria, M., Angel Lopez, M., Fernandez-Sanjuan, M., Lacorte, S., Barata, C., 2010. Comparative toxicity of single and combined mixtures of selected pollutants among larval stages of the

- native freshwater mussels (*Unio elongatulus*) and the invasive zebra mussel (*D. polymorpha*). *Sci. Total Environ.* 408, 2452-2458.
- Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M.C., Bayona, J.M., Barata, C., 2009. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *D. polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 149, 281-288.
- Faria, M., Pavlichenko, V., Burkhardt-Medicke, K., Soares, Amadeu M. V. M., Altenburger, R., Barata, C., Luckenbach, T., 2016. Use of a combined effect model approach for discriminating between ABCB1-and ABCC1-type efflux activities in native bivalve gill tissue. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 297, 56-67.
- Faria, M., Huertas, D., Soto, D.X., Grimalt, J.O., Catalan, J., Carmen Riva, M., Barata, C., 2010. Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*D. polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro River (NE Spain). *Chemosphere* 78, 232-240.
- Fields, P., Eraso, A. 2020. A year in the salt marsh: Seasonal changes in gill protein expression in the temperate intertidal mussel *Geukensia demissa*. *Marine Environ. Res.* 161, 105088.
- Fliedner, A., Ruedel, H., Knopf, B., Weinfurtner, K., Paulus, M., Ricking, M., Koschorreck, J., 2014. Spatial and temporal trends of metals and arsenic in german freshwater compartments. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 5521-5536.
- Frank, S. N., Singer, Ch., Sures, B. 2008. Metallothionein (MT) response after chronic palladium
- Gagné, F., Auclair, J., Turcotte, P., Gagnon, C., Peyrot, C., Wilkinson, K., 2019. The influence of surface waters on the bioavailability and toxicity of zinc oxide nanoparticles in freshwater mussels. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.*
- Gagne, F., Auclair, J., Turcotte, P., Gagnon, C., 2013. Sublethal effects of silver nanoparticles and dissolved silver in freshwater mussels. *J. Toxicol. Environ. Health-Part A-Current Issues* 76, 479-490.

- .Gómez-Mendikute A, Cajaraville MP. 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicol In Vitro*. 17(5-6) 539-46.
- González-Mira, A., Torreblanca, A., Hontoria, F., Navarro, J.C., Mañanós, E., Varó, I. 2018. Effects of ibuprofen and carbamazepine on the ion transport system and fatty acid metabolism of temperature conditioned juveniles of *Solea senegalensis*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, Volume 148, 693-701,
- Griffiths, G.D., 2014. 19 The potential for misuse of ribosome-inactivating proteins. *Ribosome-Inactivating Proteins* 281-286. En *Ribosome-inactivating proteins: Ricin and related proteins*. D. A. Lappi, y F Stirpe (Eds). Wiley.
- Grøsvik, E., Jonsson, H., Schiedek, D., Goksøyr, A., 2006. Expression of cytoskeletal proteins, cross-reacting with anti-AYP1A, in *Mytilus* sp. exposed to organic contaminants. *Aquat. Toxicol.* 78, S42-S48, Elsevier.
- Grosell, M., Brix, K., Esbaugh, AJ., Munley, K., 2012 Investigations into the mechanism of lead toxicity to the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis* *Aquat. Toxicol.* 106-107, Pages 147-156.
- Gómez-Mendikute, A., Cajaraville, Mp., 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicol. in vitro*, 17, p 5-6.
- Herman, P.M.J., and Scholten, H. 1990. Can suspension- feeders stabilise estuarine ecosystems? In *Trophic Relationships in the Marine Environment*, eds. M Barnes and RN. Gibson, pp. 104-116. Aberdeen, UK: Aberdeen University Press
- Horohov, J., Silverman, H., Lynn, W., Dietz, T. H. 1992. Ion transport in the freshwater zebra
- Ivankovic, D., Pavicic, J., Beatovic, V., Klobucar, R. S., Vinko, G. I. 2009. Inducibility of metallothionein biosynthesis in the whole soft tissue of zebra mussels *D. polymorpha* exposed to cadmium, copper, and pentachlorophenol. *Environ. Toxicol* 2010, 25 (2), 198-211.

- Iwasa, J., Arshall, W., 2020. Karp's cell and molecular biology. Concepts and experiments. Ninth edition. Wiley.
- Josefsson, M., Andersson, B., 2001. The Environmental Consequences of Alien Species in the Swedish Lakes Mälaren, Hjälmaren, Vänern and Vättern. *Ambio* Vol. 30 No. 8.
- Jiménez, P.J., López, M.A., Altaba, C., Rofes, J., Viñado, J., 2001. Localización y evaluación de una nueva invasión biológica: el mejillón cebra (*D. polymorpha*) en el Ebro. Ministerio de Medio Ambiente.
<http://www.revistaaquatic.com/documentos/docs/mejilloncebra2.pdf>
- Kerambrun, E., Rioult, D., Delahaut, L., Evariste, L., Pain-Devin, S., Auffret, M., Geffard, A., David, E., 2016. Variations in gene expression levels in four european zebra mussel, *D. polymorpha*, populations in relation to metal bioaccumulation: A field study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 134, 53-63.
- Kerambrun, E., Delahaut, L., Geffard, A., David, E., 2018. Differentiation of sympatric zebra and quagga mussels in ecotoxicological studies: A comparison of morphometric data, gene expression, and body metal concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 154, 321-328.
- Kim, H. J., Hwang, N. R., & Lee, K. J. 2007. Heat shock responses for understanding diseases of protein denaturation. *Mol. Cells* 30 23(2) 123-31.
- Kraemer LD, Evans D, Dillon PJ. 2013. Temporal and spatial variation in Hg accumulation in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): possible influences of DOC and diet. *Ecotoxicol Environ Saf.* 91:71-8
- Kwan, K., Chan, H.M., de Lafontaine, Y., 2003. Metal contamination in zebra mussels (*D.*
- Langston, W. J.; Bebianno, M. J. 2011. Metal metabolism in Aquatic Environments. Springer.
- Lebrun, J.D., Dufour, M., Uher, E., Fabure, J., Mons, R., Charlatchka, R., Gourlay-France, C., Fechner, L.C., Ferrari, B.J.D., 2017. To what extend the dam dredging can influence the background level of metals in the Rhine River: Using chemical and biological long-term monitoring to answer. *Knowledge Manage. Aquat. Ecosyst.* 54.
- Lecoœur, S., Videmann, B., Berny, P., 2004. Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *D. polymorpha*. *Environ. Res.* 94, 184-191.

- Leiers, B.; Kampkotter, A.; Grevelding, C. G.; Link, C. D.; Johnson, T. E.; Henkle-Du'hrsen, K., 2013. A stress-responsive glutathione S- transferase confers resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* 34 (11), 1405–1415.
- Lowe, D. M., & Pipe, R. K. (1987). Molecular, cellular and physiological effects of oil-derived hydrocarbons on molluscs and their use in impact assessment. *Phil. Trans. of the Royal Society of London. B, Biol.Sci.*, 316(1181), 603-623.
- Lowe, D.M. and Pipe, R.K., 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells - an in-vitro study. *Aquat. Toxicol.* 30, 357-365.
- Lowe, T.P. and Day, D.D., 2002. Metal concentrations in zebra mussels and sediments from embayments and riverine environments of eastern Lake Erie, southern Lake Ontario, and *tetralasmus*. *PLoS One* 9, e89481.
- Magi, E., Liscio, C., Pistarino, E., Santamaria, B., Di Carro, M., Tiso, M., Scalon, A., Renzone, G., Cosulich, M.E., 2008. Interdisciplinary study for the evaluation of biochemical alterations on mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to a tributyltin-polluted area. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 671-678.
- Magni, S., Della Torre, C., Garrone, G., D'Amato, A., Parenti, C.C., Binelli, A., 2019. First evidence of protein modulation by polystyrene microplastics in a freshwater biological model. *Environ. Pollut.* 250, 407-415.
- Magni, S., Gagne, F., Andre, C., Della Torre, C., Auclair, J., Hanana, H., Parenti, C.C., Bonasoro, F., Binelli, A., 2018. Evaluation of uptake and chronic toxicity of virgin polystyrene microbeads in freshwater zebra mussel *D. polymorpha* (mollusca: Bivalvia). *Sci. Total Environ.* 631-632, 778-788.
- Marsano, F., Boatti, L., Cavaletto, M., Magnelli, V., Dondero, F., Viarengo, A. 2009. Effects of Mercury on *Dictyostelium discoideum*: Proteomics Reveals the Molecular ogically induced disturbances in heterogeneous metacommunities. *Ecosphere* 10, e02662.
- McCorkle-Shirley, S. 1982. Effects of photoperiod on sodium flux in *Corbicula fluminea* (Mollusca: Bivalvia). *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.*, 71(2), 325-327.

- Medler, S., Thompson, C.C., Dietz, T.H., Silverman, H., 1999. Ionic effects on intrinsic gill muscles in the freshwater bivalve, *D. polymorpha*. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 122, 163-172.
- Mersch, J., Pihan, J. C. 1993. Simultaneous assessment of environmental impact on condition and trace metal availability in zebra mussels *D. polymorpha* transplanted into the Wiltz River, Luxembourg. Comparison with the aquatic moss. *Archives Environ. Cont. Toxicol.* 25,353-364.
- Muralidharan, S., Thompson E., Raftos D., Haynes P. 2011. Quantitative proteomics of heavy metal stress responses in Sydney rock oysters. *Proteomics*, 12, 906–921
- Navarro, A., Campos, B., Barata, C., Pina, B., 2013. Transcriptomic seasonal variations in a natural population of zebra mussel (*D. polymorpha*). *Sci. Total Environ.* 454, 482-489.
- Navarro, A., Faria, M., Barata, C., Pina, B., 2011. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environ. Pollut.* 159, 100-107.
- Navarro, A., Weissbach, S., Faria, M., Barata, C., Pina, B., Luckenbach, T., 2012. Abcb and abcc transporter homologs are expressed and active in larvae and adults of zebra mussel and induced by chemical stress. *Aquat. Toxicol.* 122, 144-152.
- Navarro, A., Quiros, L., Casado, M., Faria, M., Carrasco, L., Benejam, L., Benito, J., Diez, S., Raldua, D., Barata, C., Bayona, J.M., Pina, B., 2009. Physiological responses to mercury in feral carp populations inhabiting the low Ebro River (NE Spain), a historically contaminated
- Pain-Devin, S., Cossu-Leguille, C., Geffard, A., Giamberini, L., Jouenne, T., Minguez, L., Naudin, B., Parant, M., Rodius, F., Rousselle, P., Tarnowska, K., Daguin-Thiebaut, C., Viard, F., Devin, S., 2014. Towards a better understanding of biomarker response in field survey: A case study in eight populations of zebra mussels. *Aquat. Toxicol.* 155, 52-61.
- Palacios Marco, M., 2015. Detecció genètica mitjançant PCR a temps real de la presència de l'espècie invasora musclo zebrat (*D. polymorpha*). Memoria de Trabajo Fin de Grado. Universitat de Girona.

- Pagliarani A, Ventrella V, Trombetti F, Pirini M, Trigari G, Borgatti AR. 1996 Mussel microsomal Na⁺, Mg²⁺-ATPase sensitivity to waterborne mercury, zinc and ammonia. *Comp Biochem. Physiol. - Part C* 113: 185-191.
- Pagliarani A, Bandiera P, Ventrella V, Trombetti F, Pirini M, Borgatti AR. 2006. Response to alkyltins of two Na⁺-dependent ATPase activities in *Tapes philippinarum* and *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicol In Vitro*. 20(7)1145-53.
- Pattnaik, S., Chainy, G.B.N., Jena, J.K., 2007. Characterization of Ca²⁺-ATPase activity in gill microsomes of freshwater mussel, *Lamellidens marginalis* (Lamarck) and heavy metal modulations. *Aquaculture* 270, 443-450.
- Pavin-Devin, S., Cossu-Leguille, C., Geffard, A., Giambérini, L., Jouenne, T., Minguez, L., Naudin, B, Parant, M., Rousselle, P., Rodius, F., Tarnowska, K., Thiébaud, C., Viard, F., Devin, S., 2014. Towards a better understanding of biomarker response in field survey: A case study in eight population of zebra mussels. *Aquat. Toxicol.*, 155, 52-61
- Piechnik, C., Höckner, M., Pesreiro de Souza, Mr., Donatti, L., Tomanek, L., 2017. Time course of lead induced proteomic changes in gill of the Antarctic limpet *Nacella Concinna* (Gastropoda: Patellidae). *J Proteomics* 151 (2017) 145–161
- Pimentel, D., Lach, L, Zuniga, R., Morrison, D. 2000. Environmental and Economic Costs of Nonindigenous Species in the United States, *BioSci*, 50, (1), 53–65
- Piña, B., Casado, M., Quirós L, 2007. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring, *TrAC* 26 (11)2007 1145-1154
- Pina, B. and Barata, C., 2011. A genomic and ecotoxicological perspective of DNA array studies in aquatic environmental risk assessment. *Aquat. Toxicol.* 105, 40-49.
- Pina, B., Navarro, L., Barata, C., Raldua, D., Martinez, R., Casado, M., 2018. Omics in zebrafish teratogenesis. *Teratogenicity Testing: Methods and Protocols* 1797, 421-441.
- Raldua, D., Campos, B., Barata, C., Piña, B., García-Reyero, N., Babin, P.J., 2013. Deciphering emerging toxicological effects of pharmaceuticals on aquatic organisms by using *Daphnia magna* and *Danio rerio* as model organisms. *Compr. Anal. Chem.* 62 611-647.

- Roditi, A., Fisher, S. 1999. Rates and routes of trace element uptake in zebra mussels. *Limnol. Oceanogr.* 44 (7) 1730-1749
- Rodríguez-Ortega, MJ., Rodríguez-Ariza, A., Grøsvik, BE., López-Barea, J., 2003. Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. *Proteomics* ,3,1535–1543.
- Rocher, B., Bultelle, F., Chan, P., Le Foll, F., Letendre, J., Monsinjon, T., ... & Knigge, T. 2015. 2-DE Mapping of the blue mussel gill proteome: the usual suspects revisited. *Proteomes*, 3(1), 3-41.
- Ruiz-Altaba, C., 2001. El temido mejillon cebra empieza a invadir los rios espanoles desde el curso bajo del rio Ebro. *Quercus* 188 50-51.
- Rutzke, M.A., Gutenmann, W.H., Lisk, D.J., Mills, E.L., 2000. Toxic and nutrient element concentrations in soft tissues of zebra and quagga mussels from lakes Erie and Ontario. *Chemosphere* 40, 1353-1356.
- Shoults-Wilson, W.A., Elsayed, N., Leckrone, K., Unrine, J., 2015. Zebra mussels (*D. polymorpha*) as a biomonitor of trace elements along the southern shoreline of lake Michigan. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 412-419.
- Snyder, M.J., Girvetz, E., Mulder, E. P. 2001. Induction of Marine Mollusc Stress Proteins by Chemical or Physical Stress. *Archives Environ. Cont. Toxicol.*, 41, 22-29.
- Soto, D.X., Roig, R., Gacia, E., Catalan, J., 2011. Differential accumulation of mercury and other trace metals in the food web components of a reservoir impacted by a chlor-alkali plant (Flix, Ebro River, Spain): Implications for biomonitoring. *Environ. Pollut.* 159, 1481-1489.
- Stekhoven, Feico M. A. H. Schuurmans, van der Velde, G., Lee, T., Bottrill, A.R., 2015. Proteomic study of the brackish water mussel *Mytilopsis leucophaeata*. *Zool. Stud.* 54, 22.
- Strungaru, S., Nicoara, M., Teodosiu, C., Baltag, E., Ciobanu, C., Plavan, G., 2018. Patterns of toxic metals bioaccumulation in a cross-border freshwater reservoir. *Chemosphere* 207, 192-202.

- Sun, B., Hu, Y., 2016. A novel small heat shock protein of *Haliotis discus hannai*: characterization, structure modeling, and expression profiles under environmental
- Torreblanca, A., López – Barea J., 2005. Proteómica: conceptos, desarrollo actual y aplicación en monitorización ambiental. *Revista de Toxicología*, 22, (2) 72-73.
- Uriu-Adams J Y, Keen C L, 2005. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol. Aspects Med.*, 26: 268-298.
- Valdez Domingos FX, Azevedo M, Silva MD, Randi MA, Freire CA, Silva de Assis HC, Oliveira Ribeiro CA. 2007. Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. *Environ Res.* 2007 105(3) 350-63.
- Vanderbush, B., Longhenry, Ch., Lucchesi, D., Barme, M., 2021. A Review of Zebra Mussel Biology, Distribution, Aquatic Ecosystem Impacts, and Control with Specific Emphasis on South Dakota, USA. *Open J. Ecol.* , Vol.11 No.2.
- Villarroel, J., Acosta, V., Arrieche, D., 2016. Physiological condition of an arca zebra (bivalvia: Arcidae) population from Chacopata, Sucre, Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 64, 1345-1352.
- Voets, J. Bervoets, L, Blust, R. 2004. Cadmium bioavailability and accumulation in the presence of humic acid to the zebra mussel, *D. polymorpha*. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1003-1008.
- Voets, J., Talloen, W., de Tender, T., van Dongen, S., Covaci, A., Blust, R., Bervoets, L., 2006. Microcontaminant accumulation, physiological condition and bilateral asymmetry in zebra mussels (*D. polymorpha*) from clean and contaminated surface waters. *Aquat. Toxicol.* 79, 213-225.
- Vörösmarty, C. J., McIntyre, P. B., Gessner, M. O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., ... & Davies, P. M. 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, 467(7315), 555-561.
- Wanderbush, B., Longhenry, Ch., Lucches, D., Barnes, M., 2021. A Review of Zebra Mussel Biology, Distribution, Aquatic Ecosystem Impacts, and Control with Specific Emphasis on South Dakota, USA. *Open J. Toxicol.* Volume 11, n. 2.

- Wilcox, S. J., and T. H. Dietz. 1995. Potassium transport in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *J. Exp. Biol* 198: 861-868.
- Wilson, W.A., Fritts, A.K., Fritts, M.W., Unrine, J.M., Casper, A.F., 2018. Freshwater mussel (unionidae) shells document the decline of trace element pollution in the regional watersheds of Chicago (Illinois, USA). *Hydrobiologia* 816, 179-196.
- Willkins, M. R., Apple, D. 2007. Ten years of the proteome. *Proteome Res.* pp1-13.
- Weihrauch, D., Ziegler, A., Towle, D. 2002. Active ammonia excretion across the gills of the green shore crab *Carcinus maenas*: participation of Na⁺/K⁺-ATPase, V-type H⁺-ATPase and functional microtubules. *J Exp Biol* (2002) 205 (18): 2765–2775.
- Yu, J. R., Chai, J. Y. 1995. Localization of actin and myosin in *Cryptosporidium parvum* using immunogold staining. *Korean J Parasitol*, 33 (3), p. 155-164.
- Yurchenko VV, Morozov AA, Fedorov RA, Bakina LG, Zgoda VG, Tikhonova OV. 2022. Dataset on the effects of environmentally relevant humic acid concentrations on the liver protein profile in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Data Brief.* 5;40:
- Zhou, H.-X., Schreiber, G., Haran, G. 2009. Fundamental Aspects of Protein-Protein Association Kinetics. *Chem. Rev.*, volume 109 (3) 839-60.
- Zhong, H., Kraemer, L., Evans, D., 2013. Influence of body size on cu bioaccumulation in zebra mussels *D. polymorpha* exposed to different sources of particle-associated Cu. *J. Hazard. Mater.* 261, 746-752.