



TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biotecnología

**Evaluación de los efectos moleculares y de la
respuesta ecotoxicológica de *Chironomus
riparius* ante la interacción entre el ácido de
dímero de óxido de hexafluoropropileno
(GenX) y el aumento térmico**

Nuria Marcos San Román

Villaviciosa de Odón, *junio 2026*

ANEXO IX

Título del Trabajo: Evaluación de los efectos moleculares y de la respuesta ecotoxicológica de *Chironomus riparius* ante la interacción entre el ácido de dímero de óxido de hexafluoropropileno (GenX) y el aumento térmico

Este trabajo ha sido realizado en La Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), una universidad pública española fundada en 1972. La sede central de la universidad está organizada en varios campus localizados en Madrid, entre ellos el campus de Ciudad Universitaria, el campus de Senda del Rey y el campus tecnológico de Las Rozas, además del Rectorado situado en el centro de la ciudad. La institución cuenta además con una extensa red de centros asociados distribuidos por el territorio nacional y en distintos países, lo que la convierte en una de las principales universidades de educación superior a distancia.

El presente trabajo se desarrolló en el grupo de Biología y Toxicología Ambiental, integrado en el Departamento de Física Matemática y de Fluidos de la Facultad de Ciencias de la UNED bajo la supervisión de Mónica Morales Camarzana y Raquel Martín Folgar. Este grupo de investigación se dedica al estudio de los efectos de compuestos químicos de origen antropogénico en el medio ambiente, con especial interés en contaminantes emergentes presentes en sistemas acuáticos. Las investigaciones realizadas por el grupo se centran en la evaluación de respuestas biológicas en organismos modelo utilizados como bioindicadores ambientales, analizando alteraciones a nivel molecular, celular y fisiológico, con el fin de mejorar la comprensión de mecanismos de toxicidad de diferentes contaminantes.

Este trabajo se desarrolló en el marco del proyecto de investigación “*Estudio de los efectos del cambio climático sobre la toxicidad de contaminantes derivados del plástico en los organismos acuáticos Chironomus riparius y Danio rerio*” (CLIPLAST; PID2023-148109OB-I00), financiado por la Agencia Estatal de Investigación (AEI) dentro del Programa Estatal para Impulsar la Investigación Científico-Técnica y su Transferencia.

Tutor/es: Raquel Martín Folgar y Mónica Morales Camarzana (UNED) y Viviana Negri (UEM).

Tabla de contenido

1. RESUMEN DEL TRABAJO	3
2. INTRODUCCIÓN	4
3. OBJETIVOS	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
4.1 Preparación de disoluciones de GenX	9
4.2 Determinación del pH del medio	9
4.3 Mantenimiento de <i>Chironomus riparius</i> en cultivo.....	9
4.4 Análisis de supervivencia	10
4.5 Exposición de las larvas a GenX.....	10
4.6 Extracción y tratamiento de ARN	10
4.7 Síntesis de ADNc	11
4.8 Análisis de la expresión mediante RT-PCR.....	11
4.9 Análisis estadístico	12
4.10 Empleo de herramientas de inteligencia artificial	12
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
5.1 Variación del pH en el medio	13
5.2 Análisis de supervivencia	14
5.3 Análisis de la respuesta molecular de <i>C. riparius</i> frente a la exposición a diferentes concentraciones ambientales de GenX	15
i) Estrés celular	15
ii) Detoxificación y respuesta a contaminantes	19
iii) Sistema endocrino y desarrollo	22
iv) Reparación del ADN y apoptosis	26
6. VINCULACIÓN DEL ESTUDIO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE (ODS).....	29
7. CONCLUSIONES	29
8. BIBLIOGRAFÍA.....	30
9. ANEXOS	38
9.1 Índice de abreviaturas	38

1. RESUMEN DEL TRABAJO

Las sustancias perfluoroalquiladas y polifluoroalquiladas (PFAS) son contaminantes emergentes persistentes y de creciente preocupación ambiental. Entre ellas, el ácido de dímero de óxido de hexafluoropropileno (HFPO-DA), conocido como GenX, se utiliza como alternativa a PFAS tradicionales, aunque sus efectos sobre organismos acuáticos

aún no se conocen completamente. Además, el incremento de temperatura asociado al cambio climático podría modificar su toxicidad. El presente Trabajo Fin de Grado evaluó los efectos ecotoxicológicos y moleculares de GenX en larvas de cuarto estadio de *Chironomus riparius* a 20 °C y 28 °C. Las larvas fueron expuestas durante 96 horas a concentraciones de 10³, 10⁴ y 10⁵ ng/L de GenX. Se analizaron la supervivencia, el pH del medio y la expresión génica de genes relacionados con estrés celular (*hsp10*, *hsp27*, *hsp60*, *hsp70*, *hsp90* y *fkbp39*), detoxificación (*Cyp9f2*, *gstO1* y *MRP1*), regulación endocrina (*EcR*, *E74*, *E93*, *DRONC*, *Vg*, *JHAMT* y *Met*) y reparación del ADN y apoptosis (*Xrcc1*, *NLK* y *DECAY*). Los resultados evidenciaron alteraciones moleculares asociadas a estrés celular, detoxificación, regulación endocrina y daño genético tras la exposición a GenX, observándose además la influencia de la temperatura sobre dichas respuestas. En conjunto, este estudio demuestra que la combinación de contaminación química y aumento térmico puede afectar procesos celulares esenciales en *C. riparius*.

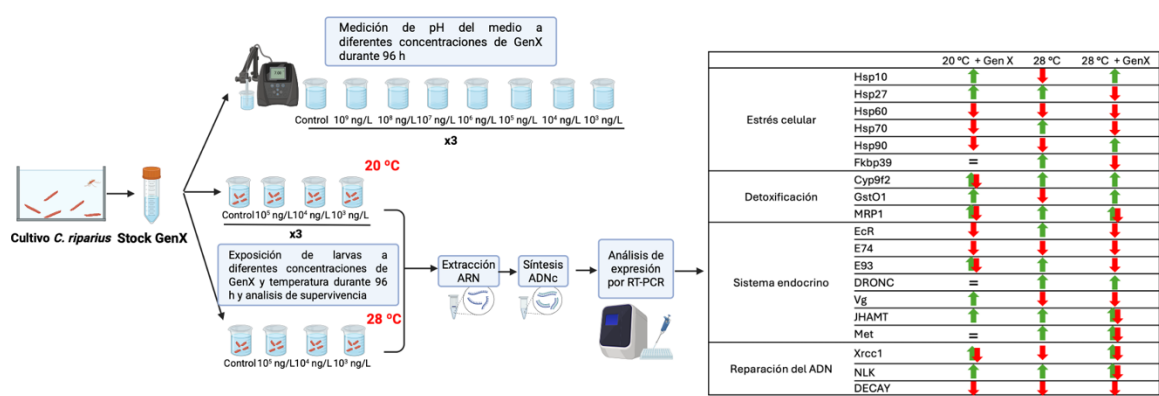


Figura 1. Resumen gráfico de los ensayos ecotoxicológicos y de las respuestas génicas observadas en *C. riparius* tras la exposición a GenX. Imagen propia generada en BioRender.

Palabras clave: GenX (HFPO-DA), PFAS, *Chironomus riparius*, ecotoxicología, estrés térmico, expresión génica, contaminantes emergentes, estrés oxidativo.

2. INTRODUCCIÓN

La contaminación química de los ecosistemas acuáticos representa uno de los principales desafíos ambientales a nivel global debido a la liberación continua de compuestos sintéticos procedentes de actividades antropogénicas, como la agricultura, industria y los vertidos domésticos, que favorecen su entrada a ecosistemas acuáticos.¹ Estas sustancias pueden deteriorar la calidad del agua y provocar efectos adversos en los organismos acuáticos, alterando procesos fisiológicos y metabólicos.² En este contexto, la preocupación ha aumentado por los denominados contaminantes emergentes, que se definen como sustancias químicas de origen natural o sintético recientemente identificados en el medio ambiente, o cuyos efectos tóxicos aún no se conocen al

completo.³ Este término engloba un amplio grupo de compuestos con diferentes propiedades fisicoquímicas y comportamientos en el medio ambiente, por lo que se dificulta su detección, evaluación de riesgos y regulación. Paralelamente, el cambio climático se ha consolidado como uno de los principales factores de alteración de los ecosistemas, actuando como un elemento adicional que puede modificar la dinámica y los efectos de los contaminantes. El calentamiento del sistema climático, atribuido principalmente a la actividad humana, ha provocado un incremento aproximado de 1,1 °C en la temperatura media global desde la era preindustrial.⁴ Este aumento de temperatura afecta a todos los componentes del sistema climático, incluyendo los ecosistemas acuáticos, donde se ha observado un incremento del contenido térmico del océano y un cambio en las condiciones fisicoquímicas del agua.⁵ El aumento de temperatura del agua puede modificar la fisiología de los organismos acuáticos, alterando tasas metabólicas, procesos enzimáticos y mecanismos de detoxificación, lo que puede influir en su sensibilidad frente a contaminantes químicos. En este sentido, la interacción entre contaminantes emergentes y factores ambientales como la temperatura representa un área clave de ecotoxicología, pues el cambio climático puede potenciar o modificar los efectos tóxicos de estos compuestos. No obstante, la mayoría de los ensayos de toxicidad se lleva a cabo bajo condiciones experimentales estandarizadas que no contemplan escenarios de incremento térmico, lo que podría limitar la representatividad ecológica de los resultados y conducir a una evaluación imprecisa del riesgo ambiental.

Entre los contaminantes emergentes que mayor preocupación han suscitado en las últimas décadas se encuentran las sustancias perfluoroalquiladas y polifluoroalquiladas (PFAS), un amplio grupo de compuestos sintéticos de gran preocupación ambiental debido a su elevada persistencia, movilidad y potencial de bioacumulación, empleados desde la década de 1940 en numerosas aplicaciones industriales y productos de consumo.⁶ Estos compuestos se caracterizan por contener cadenas perfluoroalquiladas con el grupo funcional C_nF_{2n+1} , responsable de sus propiedades fisicoquímicas únicas, como la elevada resistencia térmica y estabilidad química,⁷ denominándolos así como “químicos eternos”.⁸ Estas características derivan de la gran estabilidad del enlace carbono-flúor, lo que dificulta su degradación en el medio ambiente. Gracias a ello, los PFAS han sido ampliamente utilizados en variedad de productos, como textiles impermeables, envases alimentarios, espumas contra incendios, dispositivos médicos y productos cosméticos. Como consecuencia de su uso extensivo, muchos de estos compuestos han sido detectados en diferentes compartimentos ambientales, como suelo, aguas, organismos e

incluso en sangre humana.⁷ Aunque existen miles de compuestos perteneciente a esta familia, gran parte de la investigación científica ha sido centrada únicamente en el ácido perfluorooctanóico (PFOA) o el perfluorooctanosulfonato (PFOS).⁶

Debido a su estabilidad química y amplio uso, los PFAS pueden acumularse en cadenas tróficas y ecosistemas desde el inicio de su producción. La exposición humana puede producirse mediante la ingesta de agua potable, alimentos envasados o productos tratados con PFAS.⁹ Su persistencia, gran distribución ambiental y potenciales efectos adversos sobre la salud humana y ecosistemas han generado una creciente preocupación científica y regulatoria, especialmente en PFAS de cadena larga como el PFOA y PFOS. Como consecuencia, la industria ha desarrollado compuestos fluorados destinados a sustituir a los PFAS tradicionales. Entre ellos destaca el ácido de dímero de óxido de hexafluoropropileno (HFPO-DA), conocido como GenX (Figura 2), nombre comercial de la sal amónica del ácido HFPO-DA.¹⁰ Este compuesto pertenece al grupo de los ácidos perfluoroalquil éter carboxílicos (PFECAs), una subfamilia dentro de los PFAS caracterizada por la presencia de enlaces éter en su estructura química.⁶

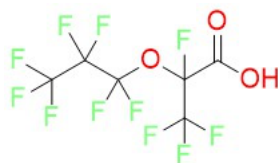


Figura 2. Estructura química del HFPO-DA (GenX). Figura creada con ChemDraw.¹⁰

GenX es un compuesto desarrollado para la producción de fluoropolímeros sin el uso de PFOA. Estos materiales presentan elevada resistencia térmica, estabilidad química y propiedades antiadherentes, lo que favorece su aplicación en recubrimientos antiadherentes, textiles repelentes al agua, componentes electrónicos, así como aplicaciones en la industria farmacéutica, biotecnológica y en la fabricación de semiconductores.¹¹ Aunque fue desarrollado como alternativa a los PFAS de cadena larga, el conocimiento acerca de sus efectos tóxicos es limitado en comparación a compuestos tradicionales como el PFOA o el PFOS. No obstante, diversos estudios han detectado este compuesto en diversos compartimentos ambientales, especialmente en aguas superficiales y agua potable en diferentes regiones del mundo próximas a instalaciones productoras de fluoropolímeros.^{10,12} Además, se han registrado concentraciones de GenX de hasta 631 ng/L en aguas superficiales y superiores a 4 µg/L en agua potable en zonas próximas a instalaciones industriales productoras de fluoropolímeros, lo que sugiere su liberación y persistencia en el medio ambiente.¹³

Debido a su presencia en los ecosistemas acuáticos y a la escasez de estudios sobre sus efectos biológicos, resulta necesario evaluar el impacto potencial de este GenX en organismos acuáticos. En este contexto, el presente estudio analiza tanto los efectos de la exposición a GenX en condiciones óptimas de crecimiento de *C. riparius* (20 °C), como bajo un incremento de temperatura asociado a escenarios de cambio climático (28 °C).

Los macroinvertebrados bentónicos son ampliamente utilizados en estudios de ecotoxicología por su sensibilidad a contaminantes y su estrecha interacción con el medio.¹⁴ Entre ellos el díptero *Chironomus riparius* (Figura 3) constituye uno de los organismos modelo más empleados en estudios estandarizados desarrollados por organismos internacionales como la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA).^{15,16} Esta especie presenta una amplia distribución en ecosistemas de agua dulce y desempeña un papel fundamental en las redes tróficas acuáticas, participando en la transferencia de materia y energía desde el sedimento y los productores primarios hacia niveles tróficos superiores.¹⁷



Figura 3. Anatomía de la larva de *Chironomus riparius* en su cuarto estadio. Imagen generada con IA.¹⁸

C. riparius presenta diversas características que facilitan su uso en ensayos ecotoxicológicos, como su ciclo de vida relativamente corto, completándose en aproximadamente 25 días en condiciones de laboratorio, así como la posibilidad de evaluar diferentes parámetros biológicos a lo largo de todo su ciclo vital, incluyendo el desarrollo y la reproducción.¹⁹ Este ciclo comprende diferentes fases bien definidas: huevos, cuatro estadios larvarios, pupa y adulto (Figura 4).

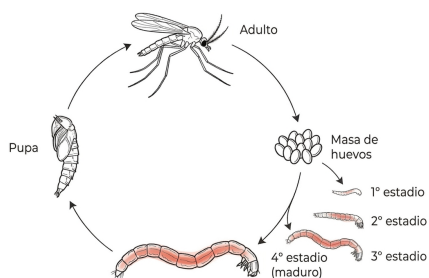


Figura 4. Ciclo de vida de *Chironomus riparius*. Imagen generada con IA.²⁰

Tras la puesta, los huevos eclosionan en pocos días dando lugar a las larvas, consideradas la fase más relevante desde el punto de vista ecotoxicológico. Durante los

primeros estadios, las larvas habitan en sedimentos donde construyen tubos con partículas de sustrato y secreciones salivales, lo que las expone directamente a contaminantes presentes tanto en agua como en el sedimento, lo que permite estudiar distintos escenarios de exposición a contaminantes en ecosistemas acuáticos.¹⁹ El cuarto estadio larvario es el más usado en ensayos ecotoxicológicos debido a su mayor tamaño y elevada actividad metabólica, facilitando el análisis de procesos fisiológicos y moleculares, como respuestas de estrés, detoxificación y daño en el ADN.^{15,19} Posteriormente, las larvas pasan a la fase de pupa, tras la cual emerge el adulto, único estadio aéreo del ciclo.¹⁷ En este contexto, el estudio de los efectos de contaminantes emergentes en organismos acuáticos resulta fundamental para comprender los riesgos asociados a su liberación en el medio ambiente. La evaluación de la respuesta de organismos como *C. riparius* frente a estos compuestos permite mejorar el conocimiento sobre el impacto potencial en ecosistemas de agua dulce. En base a lo anterior, en este trabajo se plantea la hipótesis de que la exposición a GenX puede inducir efectos adversos en *C. riparius*, y que estos efectos podrían verse potenciados por el efecto de la temperatura.

3. OBJETIVOS

El objetivo general de este Trabajo Fin de Grado (TFG) es evaluar la respuesta ecotoxicológica del contaminante emergente GenX en larvas *C. riparius*, considerando tanto el efecto de diferentes concentraciones ambientales como la influencia de la temperatura como factor ambiental asociado al cambio climático.

Se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de GenX sobre el pH del medio de cultivo, con el fin de evaluar posibles cambios en las condiciones fisicoquímicas que pueden influir en la respuesta de los organismos.
- 2- Analizar la supervivencia de larvas de cuarto estadio de *C. riparius* tras la exposición a diferentes concentraciones de GenX durante 96 horas de exposición, así como el efecto de GenX combinado con estrés térmico.
- 3- Determinar los efectos del GenX a nivel molecular analizando directamente genes implicados en la ruta hormonal de la ecdisona, la respuesta a estrés celular y el sistema de detoxificación celular, reparación del ADN y respuesta al estrés.
- 4- Determinar los efectos combinados del GenX y estrés térmico a nivel molecular analizando directamente genes implicados en la ruta hormonal de la ecdisona, la respuesta a estrés celular y el sistema de detoxificación celular, reparación del ADN y respuesta general al estrés.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Preparación de disoluciones de GenX

El compuesto empleado en este estudio fue ácido de dímero de óxido de hexfluoropropileno (HFPO-DA, GenX), adquirido en forma líquida (Fluorochem Ltd.; CAS: 13252-13-6). Se preparó una disolución madre inicial de GenX de $2 \cdot 10^9$ ng/L (2 g/L) mediante la adición directa de 59,6 μ L de GenX comercial (96% de pureza) a un volumen final de 50 mL de medio de *C. riparius*, calculado a partir de la densidad del compuesto (1,748 g/mL). La disolución se mantuvo en recipientes cerrados y protegidos de contaminación externa. A partir de esta disolución madre se realizaron diluciones seriadas en medio de cultivo con el fin de obtener las concentraciones de trabajo (10^3 , 10^4 y 10^5 ng/L) mediante la transferencia de volúmenes conocidos de la disolución previa a nuevos volúmenes de medio, obteniendo concentraciones decrecientes.

4.2 Determinación del pH del medio

El pH del medio de cultivo se evaluó con el objetivo de analizar posibles variaciones en función de la concentración de GenX y su potencial efecto acidificante. Para ello, se prepararon diferentes disoluciones de GenX en medio de cultivo 1X previamente filtrado con un filtro de 40 μ m, mediante diluciones seriadas a partir de la disolución madre. Se evaluaron siete concentraciones diferentes de GenX desde 10^9 a 10^3 ng/L, incluyendo el control sin contaminante. El pH se midió en distintos tiempos de exposición (t_0 , 30 min, 1 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h), para evaluar la evolución temporal del medio. Las medidas se realizaron por triplicado y el experimento se llevó a cabo en tres ensayos diferentes, con el objetivo de garantizar la reproducibilidad de los resultados. El pH de cada una de las disoluciones se midió utilizando un pH-metro previamente calibrado, registrándose los valores correspondientes para cada concentración.

4.3 Mantenimiento de *Chironomus riparius* en cultivo

Las larvas de *C. riparius* empleadas proceden de cultivos mantenidos en el laboratorio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), siguiendo protocolos estandarizados de ensayos ecotoxicológicos establecidos por organismos internacionales.^{16,21} Los organismos se mantuvieron en un medio de cultivo preparado a partir de una disolución concentrada (10X), posteriormente diluida a una concentración de trabajo (1X). El medio final contenía cloruro cálcico (0,5 mM), cloruro sódico (1 mM), bicarbonato sódico (0,1 mM) y fosfato monopotásico (0,025 mM). Las larvas fueron alimentadas con comida para peces (TetraMin, Tetra) cada 48 horas, a una temperatura de 20 °C, aireación constante y fotoperiodos de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

4.4 Análisis de supervivencia

Para evaluar los efectos de GenX sobre la supervivencia de *C. riparius*, se llevó a cabo un ensayo de exposición aguda de 96 horas. Las larvas fueron expuestas a tres concentraciones ambientales de GenX (10^3 ng/L, 10^4 ng/L y 10^5 ng/L), además de un grupo control sin contaminante. Se realizaron tres tratamientos, empleando 10 larvas en 50 mL de medio de cultivo. Los ensayos se llevaron a cabo bajo a 20 °C y 28 °C, con fin de evaluar la posible influencia de la temperatura en la respuesta de estos organismos. El experimento se realizó de forma independiente en ambas condiciones y con alimentación cada 48 h. La supervivencia de las larvas se registró cada 24 h, considerando como individuos muertos aquellos que no presentaban movimiento tras estimulación.

4.5 Exposición de las larvas a GenX

Para los ensayos, se emplearon larvas de cuarto estadio de *C. riparius*, seleccionadas por su mayor tamaño y actividad metabólica. Las exposiciones se realizaron en un sistema estático, utilizando unidades de 50 mL de medio con 10 larvas cada una. Los organismos fueron expuestos a tres concentraciones de GenX (10^3 ng/L, 10^4 ng/L y 10^5 ng/L), junto con un grupo control sin contaminante. Cada tratamiento se realizó por triplicado bajo dos condiciones de temperatura (20 °C y 28 °C), siendo esta última seleccionada para simular un escenario de aumento térmico asociado al cambio climático. El periodo de exposición tuvo una duración de 96 horas y las larvas fueron alimentadas cada 48 horas.

4.6 Extracción y tratamiento de ARN

El ARN total se extrajo a partir de larvas de *C. riparius* procedentes de los diferentes tratamientos experimentales, así como de los grupos control. Tras la exposición, las muestras se conservaron en -80 °C hasta su procesamiento. La extracción de ARN se realizó empleando el reactivo TRIzol (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. Las larvas se homogeneizaron en 300 μ L de TRIzol en condiciones de frío. Posteriormente, las larvas se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, recuperándose el sobrenadante. A continuación, se añadieron 60 μ L de cloroformo, se agitó vigorosamente y se incubó durante 3 minutos. Tras centrifugación a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, se recuperó la fase acuosa, a la que se le añadió el mismo volumen de isopropanol para la precipitación de ARN. La mezcla se incubó durante 10 minutos a 4 °C y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El pellet obtenido se lavó con etanol al 75 % frío, seguido de una centrifugación a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente, el ARN se resuspendió en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y se almacenó a -80

°C hasta su uso posterior. Con el fin de eliminar posibles contaminaciones de ADN genómico, el ARN obtenido se sometió a un tratamiento con ADNasa libre de ARNasas. Para ello, se preparó una mezcla de reacción que contenía el ARN, 5 μL tampón 10X y 1 μL ADNasa (10 U/ μL) (Roche), hasta un volumen final de 50 μL , incubándose a 37 °C durante 1 hora y 15 minutos. Tras la digestión, se realizó una purificación mediante adición de 100 μL agua tratada con DEPC y 150 μL de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. La fase acuosa se recuperó y se sometió a una segunda purificación con cloroformo utilizando columnas *Phase Lock Gel* (5 prime) y con centrifugación a 12.000 rpm, 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se precipitó con un volumen de isopropanol. De esta forma, se dejó reposar 10 minutos y se procedió a una centrifugación a 10.000 rpm, 10 minutos a 4 °C. El pellet obtenido se lavó con etanol al 75 % frío y se resuspendió en 50 μL de agua tratada con DEPC. La concentración y la pureza del ARN se determinaron mediante espectrofotometría, evaluando las relaciones de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{230/260}$. La integridad del ARN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.7 Síntesis de ADNc

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó a partir del ARN total mediante una reacción de retrotranscripción utilizando la enzima M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) (Invitrogen). Para cada muestra se emplearon 1000 ng de ARN, ajustando el volumen en función de la concentración determinada previamente por espectrofotometría, en un volumen final de 40 μL . Inicialmente, el ARN se mezcló con 2 μL de oligo (dT) (500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 2 μL de dNTPs (10 mM) y agua DEPC, completando el volumen inicial de reacción. Esta mezcla se incubó a 65 °C durante 5 minutos para favorecer la desnaturalización del ARN y posteriormente se enfrió en hielo. A continuación, se añadieron los componentes necesarios para la retrotranscripción, incluyendo el tampón de reacción 5X (Invitrogen), ditioneitol (DTT) (0,1 M) y la enzima transcriptasa reversa M-MLV, completando el volumen final de la reacción. La síntesis de ADNc se llevó a cabo mediante incubación a 37 °C durante 50 minutos, seguida de una etapa de inactivación enzimática a 70 °C durante 15 minutos. El ADNc obtenido se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización en los ensayos de expresión génica mediante PCR en tiempo real.

4.8 Análisis de la expresión mediante RT-PCR

El análisis de la expresión génica se realizó mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) a partir del ADNc sintetizado. Las reacciones de amplificación se realizaron empleando

un termociclador CFX96- Real-Time PCR System (Bio-Rad), en un volumen final de 10 μL por pocillo, utilizando placas multipocillo, analizando cada muestra por duplicado. La mezcla de reacción se preparó a partir de una disolución madre compuesta por 200 μL de tampón 10X, 40 μL de dNTPs, 50 μL de MgCl_2 y 680 μL de agua DEPC a la que se añadieron 40 μL de Taq ADN polimerasa (Biotools, 1 U/ μL) y el fluoróforo intercalante EvaGreen® (Biotium). Posteriormente, esta mezcla se combinó con el ADNc y agua DEPC para completar el volumen final de reacción. Los oligonucleótidos específicos (forward y reverse) se añadieron a cada pocillo en forma de mezcla a igual proporción, diluidos en agua DEPC. Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 30 s, seguida de 40 ciclos consistentes en desnaturalización a 95 °C durante 5 s, 58 °C durante 15 s, 65 °C durante 10 s y una extensión final a 65 °C durante 5 s. Se evaluó la expresión de genes implicados en diferentes rutas biológicas. Los oligonucleótidos utilizados para cada gen se detallan en la Tabla A1.

4.9 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizaron tres tratamientos. Las diferencias entre los grupos expuestos a GenX y el grupo control se evaluaron mediante análisis estadístico empleando el programa IBM SPSS Statistics 27 y las gráficas se elaboraron con Microsoft Excel 365 (Microsoft Corporation). En los ensayos de expresión génica, los niveles relativos de ARNm se normalizaron utilizando los genes de referencia gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), y proteínas ribosómicas L11 y L13 (*rpL11*, *rpL13*), y posteriormente se analizaron mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Además, se realizó un análisis ANOVA de dos vías para evaluar el efecto combinado de la concentración de GenX y la temperatura, así como las diferencias entre temperaturas para una misma concentración. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con valores de $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$. En las figuras de expresión génica, las diferencias significativas respecto al control se representaron mediante *, ** y ***, mientras que las diferencias significativas entre temperaturas para una misma concentración de GenX se indicaron mediante #, ## y ###. Esta simbología se explicitará en el pie de figura de la Figura 8, omitiéndose en las figuras siguientes para evitar redundancias.

4.10 Empleo de herramientas de inteligencia artificial

Se emplearon herramientas de inteligencia artificial como Gemini (Google) para la generación de imágenes y para el apoyo en la síntesis y revisión incluidos en el presente trabajo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Variación del pH en el medio

Se evaluó la variación del pH en el medio de cultivo en función de la concentración de GenX a lo largo del tiempo de exposición, con el objetivo de determinar si este compuesto podía alterar las condiciones fisicoquímicas del sistema y, en consecuencia, influir en la respuesta biológica de los organismos.

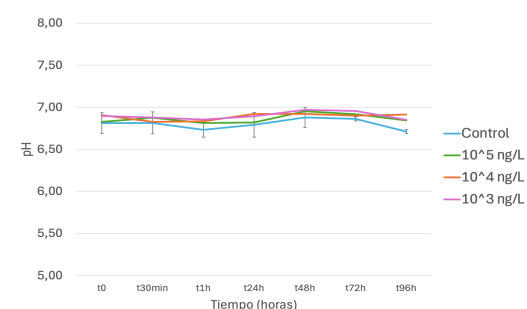


Figura 5. Variación del pH del medio en función de la concentración de GenX (10^3 - 10^5 ng/L) a lo largo del tiempo

Los resultados mostraron que el pH se mantuvo relativamente estable en el grupo control y en las concentraciones más bajas de GenX (10^3 – 10^5 ng/L), con valores comprendidos entre 6,7 y 7,0 durante todo el periodo experimental. Estas condiciones se encuentran dentro del rango considerado óptimo en ensayos ecotoxicológicos con organismos acuáticos, ya que el pH cercano a la neutralidad favorece el mantenimiento de procesos fisiológicos normales en especies como *C. riparius*.^{15,21} En contraste, a concentraciones superiores ($\geq 10^6$ ng/L) se observó una disminución acusada del pH, especialmente en 10^8 y 10^9 ng/L, donde se registraron valores aproximados de 3,7 y 2,7. Este efecto acidificante concuerda con la naturaleza química de GenX, que cuyo grupo funcional carboxílico es capaz de comportarse como ácido débil en disolución acuosa, liberando protones y contribuyendo a la acidificación del medio ($pK_a \approx 2,8$).^{6,7,11} Sin embargo, estas concentraciones no se consideraron adecuadas para los ensayos biológicos posteriores, ya que la acidificación del medio podría generar una situación multiestrés al combinar los efectos tóxicos de GenX con los derivados del descenso del pH. Por ello, las concentraciones empleadas en este estudio se seleccionaron a partir de los resultados del análisis de pH y de su relevancia ambiental.^{6,10,12}

Diversos estudios han detectado GenX en aguas superficiales y sistemas acuáticos próximos a fuentes industriales en concentraciones del orden de ng/L.^{6,10,12} En particular, se han descrito concentraciones de GenX de hasta 812 ng/L en aguas superficiales contaminadas y valores cercanos a 474 ng/L en agua potable derivada de sistemas acuáticos afectados.¹² Estas evidencias respaldan la selección del rango 10^3 – 10^5 ng/L como representativo de escenarios de exposición ambiental, adecuados para la evaluación

de efectos subletales en *C. riparius*. En conjunto, estos resultados permitieron definir un rango de concentraciones apropiado para el desarrollo de los ensayos ecotoxicológicos posteriores, garantizando tanto la estabilidad de las condiciones experimentales como la relevancia ambiental del estudio.

5.2 Análisis de supervivencia

Se evaluó la supervivencia de las larvas de *C. riparius* tras 96 horas de exposición a diferentes concentraciones de GenX ($10^3 - 10^5$ ng/L) a 20 °C para determinar posibles efectos letales en condiciones ambientales relevantes. Como se observa en la Figura 6, a 20 °C los resultados mostraron una elevada supervivencia en todos los tratamientos, sin apreciarse una relación dosis–respuesta clara entre la concentración de GenX y la mortalidad. Las variaciones observadas entre tratamientos fueron reducidas, indicando la ausencia de efectos letales significativos del compuesto en las condiciones ensayadas. A 28 °C se observó un ligero incremento de la mortalidad respecto a 20 °C, especialmente en las concentraciones más elevadas de GenX. Sin embargo, la mortalidad máxima no superó el 33 % en ninguna de las concentraciones, por lo que no fue posible determinar experimentalmente un valor fiable de LC50. En conjunto, los resultados muestran que el incremento de temperatura produjo un ligero aumento de la mortalidad incluso en el grupo control, lo que sugiere que el estrés térmico por sí solo puede afectar a la supervivencia de *C. riparius*. Además, en presencia de GenX, la respuesta varió entre concentraciones, lo que indica un posible efecto modulador de la temperatura sobre la sensibilidad del contaminante.^{22,4} No obstante, incluso bajo condiciones de temperatura aumentada, el compuesto no produjo una mortalidad elevada en el rango de concentraciones estudiado.

Las concentraciones seleccionadas en este estudio corresponden a rangos próximos a los descritos en ecosistemas acuáticos contaminados por PFAS y, además, fueron aquellas en las que el pH del medio permaneció estable. Por ello, el estudio se centró en la evaluación de posibles efectos subletales y moleculares más que en efectos letales agudos.

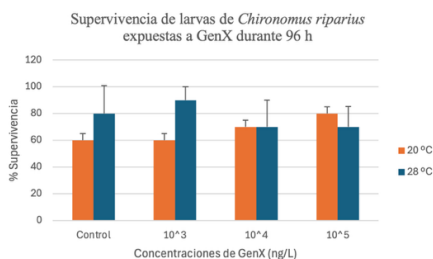


Figura 6. Porcentaje de supervivencia de larvas de cuarto estadio de *C. riparius* tras 96 horas de exposición a diferentes concentraciones de GenX (control, 10^3 , 10^4 y 10^5 ng/L) a 20 y 28 °C.

5.3 Análisis de la respuesta molecular de *C. riparius* frente a la exposición a diferentes concentraciones ambientales de GenX

La exposición a contaminantes ambientales puede inducir estrés celular a través de la alteración de la homeostasis proteica y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que conduce a la acumulación de proteínas mal plegadas y daño celular.^{23,24} En este contexto, las proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins, *HSPs*) (Figura 7) desempeñan un papel fundamental como chaperonas moleculares, facilitando el correcto plegamiento proteico, evitando la agregación de proteínas dañadas y contribuyendo a la recuperación de la función celular.²⁵

Figura 7. Esquema de la respuesta al estrés celular mediada por proteínas de choque térmico (HSPs) y su papel en la regulación de la vía apoptótica mitocondrial en *C. riparius*. La exposición a contaminantes induce la generación de ROS y daño proteico, activando *hsp70*, *hsp90*, *hsp27*, *hsp60*, *hsp10* y *fkbp39*, que modulan el plegamiento proteico y la liberación de citocromo C, regulando la formación del apoptosoma y la activación de la apoptosis. Imagen propia generada en BioRender.

Los resultados mostraron que *hsp10* no presentó alteraciones acusadas en la expresión génica tras la exposición a GenX a 20 °C, apreciándose un ligero aumento a 10^3 y 10^5

ng/L. A 28 °C se observó un aumento significativo de la expresión a 10^3 ng/L y 10^4 ng/L (Figura 8). Al comparar ambas temperaturas, el control a 28 °C presenta menores niveles de expresión que a 20 °C, lo que sugiere que el incremento térmico podría inhibir parcialmente la expresión de *hsp10*. Además, se observan diferencias significativas entre temperaturas a 10^5 ng/L, observándose una menor expresión a 28 °C. HSP10 participa junto con HSP60 en el mantenimiento de la homeostasis proteica y en el correcto plegamiento de proteínas mitocondriales.²⁵ La menor expresión observada en el control a 28 °C sugiere que el incremento térmico podría modular la expresión de *hsp10*, mientras que el aumento detectado tras la exposición a GenX a 28 °C indica una activación de mecanismos de respuesta celular frente al estrés químico y térmico combinado. Este patrón podría corresponder a una respuesta hormética, fenómeno caracterizado por una respuesta bifásica dosis–respuesta, en la que concentraciones bajas inducen mecanismos adaptativos y las concentraciones más elevadas dan efectos inhibitorios o tóxicos.³⁰ Este comportamiento concuerda con estudios que describen la regulación de proteínas de choque térmico bajo condiciones combinadas de estrés químico y térmico.^{23,26}

En el caso de *hsp27*, se observó un incremento de la expresión tras la exposición a GenX a 20 °C, significativo a 10^3 y 10^4 ng/L. A 28 °C se observó un aumento de la expresión a 10^3 ng/L, mientras que a 10^4 y 10^5 ng/L se inhibe (Figura 8), mostrando un patrón hormético. Al comparar ambas temperaturas, se observa que el control a 28 °C presenta mayores niveles de expresión que el control a 20 °C, lo que sugiere que el incremento térmico induce la expresión de *hsp27*. Además, se observan diferencias significativas entre temperaturas en todas las concentraciones, con niveles de expresión menores a 28 °C que a 20 °C. Estos resultados indican que el estrés térmico activa la expresión de *hsp27*, mientras que la exposición a GenX ejerce una modulación negativa de dicha respuesta, produciendo una inhibición de la expresión dependiente de la concentración del contaminante. HSP27 es una proteína de choque térmico implicada en la protección celular frente al estrés oxidativo y proteotóxico, participando en la estabilización de proteínas dañadas y en la inhibición de procesos apoptóticos.²⁷ Este comportamiento concuerda con estudios que describen la regulación de proteínas de choque térmico bajo condiciones ambientales estresantes.³¹

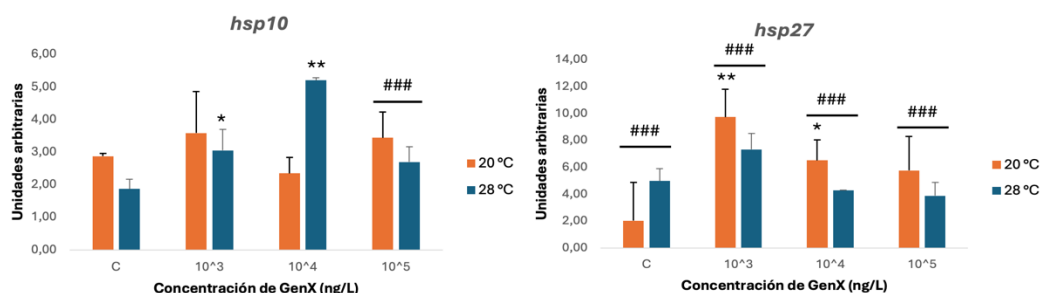


Figura 8. Expresión génica normalizada de los genes relacionados con la respuesta al estrés celular en larvas del cuarto estadio de *C. riparius* tras 96 h de exposición a diferentes concentraciones de GenX a 20 °C y 28 °C: (a) *hsp10* y (b) *hsp27*. Los valores se expresan en unidades arbitrarias (media $\pm$ desviación estándar). Se representan con * las diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$), con ** ($p < 0,01$) y con *** ($p < 0,001$). Se representan con # las diferencias significativas entre temperaturas para una misma concentración de GenX (# $p < 0,05$), con ## ($p < 0,01$) y con ### ($p < 0,001$). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una vía y ANOVA de dos vías con corrección de Bonferroni utilizando SPSS. Las gráficas fueron elaboradas con Microsoft Excel 365.

Por otro lado, la expresión de *hsp60* mostró una disminución significativa tras la exposición a todas las concentraciones estudiadas de GenX a 20 °C. A 28 °C, también se observó una inhibición de la expresión en el control y en los tratamientos con GenX (Figura 9). Al comparar ambas temperaturas, se observaron diferencias significativas entre temperaturas en 10⁴ ng/L, observándose menores niveles de expresión a 28 °C que a 20 °C. Estos resultados sugieren que el incremento térmico podría potenciar la alteración de mecanismos relacionados con la homeostasis mitocondrial. HSP60 participa en el plegamiento de proteínas mitocondriales y en el mantenimiento de la función celular, por lo que su inhibición podría relacionarse con procesos de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial.²⁵ Estudios han asociado la disminución de la expresión de *hsp60* a disfunción celular y agotamiento de la respuesta adaptativa.³²

En el caso de *hsp70*, a 20 °C no se observaron cambios estadísticamente significativos tras la exposición a GenX, pero se apreció una inhibición de la expresión a 10⁴ y 10⁵ ng/L respecto al control. Sin embargo, a 28 °C se detectó una disminución de la expresión global en todas las concentraciones estudiadas respecto al control (Figura 9). Por otro lado, se observaron diferencias estadísticamente significativas a 28 °C con respecto a 20 °C en el control y en los tratamientos expuestos a GenX (10⁴ y 10⁵ ng/L). Estos resultados sugieren que el incremento térmico activa la expresión basal de *hsp70*, mientras que GenX modula negativamente la respuesta inducida por calor. HSP70 es una de las proteínas de choque térmico implicadas en la protección celular frente al estrés químico y oxidativo, participando en el plegamiento proteico y en la prevención de la agregación de proteínas dañadas.^{23,25} El aumento observado a 28 °C concuerda con estudios que describen una mayor inducción de HSP70 bajo condiciones combinadas de estrés químico y térmico.²⁶

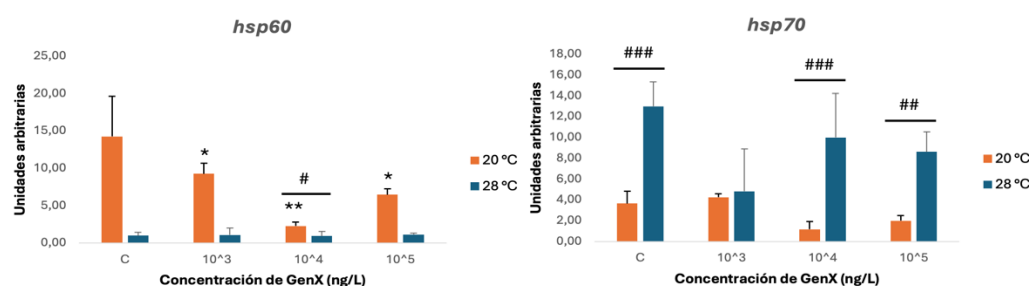


Figura 9. Expresión génica normalizada de los genes relacionados con la respuesta al estrés celular en larvas del cuarto estadio de *C. riparius* tras 96 h de exposición a diferentes concentraciones de GenX a 20 °C y 28 °C: (a) *hsp60* y (b) *hsp70*. Los valores se expresan en unidades arbitrarias (media $\pm$ desviación estándar).

La expresión de *hsp90* mostró una inhibición estadísticamente significativa en todos los tratamientos expuestos a GenX a 20 °C respecto al control. Sin embargo, a 28 °C se observó un patrón opuesto, con un incremento significativo y dependiente de la concentración de GenX (Figura 10). El control a 28 °C presentó menores niveles de expresión que a 20 °C, sugiriendo que el aumento de temperatura inhibe la expresión de *hsp90*. Además, se observaron diferencias significativas entre temperaturas a 10³ ng/L, 10⁴ ng/L y 10⁵ ng/L, registrándose mayores niveles de expresión a 28 °C que a 20 °C, lo que indica que el contaminante modula la respuesta celular frente al estrés térmico. Este patrón indica una modulación positiva de la respuesta al estrés térmico por parte del contaminante. HSP90 participa en la estabilización y regulación de proteínas implicadas en señalización celular, homeostasis proteica y respuesta al estrés.³³ La inhibición observada a 20 °C podría indicar una alteración de los mecanismos de protección celular y de la capacidad adaptativa frente al estrés inducido por GenX, mientras que el incremento detectado a 28 °C sugiere una activación compensatoria de los mecanismos de respuesta al estrés bajo condiciones de estrés combinado térmico y químico. Este comportamiento coincide con estudios que describen una mayor inducción de proteínas de choque térmico bajo escenarios ambientales más estresantes.²⁶

La expresión de *fkbp39* mostró variaciones entre tratamientos, aunque sin diferencias marcadas respecto al control. A 20 °C se observó un ligero incremento de la expresión a 10³ ng/L, seguido de una disminución en 10⁴ ng/L y una recuperación parcial en 10⁵ ng/L. A 28 °C, los niveles de expresión fueron generalmente superiores y más estables entre concentraciones (Figura 10). Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre temperaturas en el control y en 10⁴ y 10⁵ ng/L, registrándose mayores niveles de expresión a 28 °C con respecto a 20 °C, sugiriendo que el incremento térmico parece inducir la expresión de este gen. FKBP39 participa en el plegamiento proteico y en la regulación de complejos asociados a proteínas de choque térmico, especialmente HSP90.²⁹ Aunque los cambios observados fueron moderados, el aumento general a 28 °C

podría relacionarse con una mayor demanda de mecanismos de regulación proteica bajo condiciones de estrés térmico combinado con exposición a GenX.

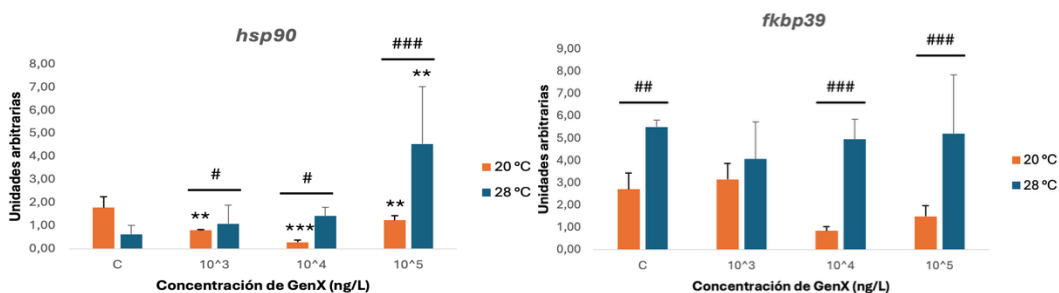


Figura 10. Expresión génica normalizada de los genes relacionados con la respuesta al estrés celular en larvas del cuarto estadio de *C. riparius* tras 96 h de exposición a diferentes concentraciones de GenX a 20 °C y 28 °C: (a) *hsp90* y (b) *fkbp39*. Los valores se expresan en unidades arbitrarias (media $\pm$ desviación estándar).

En conclusión, los resultados obtenidos para los genes relacionados con la respuesta al estrés celular muestran que la exposición a GenX modula la expresión de diferentes genes de choque térmico en *C. riparius*, observándose además una clara influencia de la temperatura sobre dicha respuesta. A 20 °C predominaron respuestas asociadas a la inhibición de genes implicados en la homeostasis proteica y mitocondrial, como *hsp60*, *hsp70* y *hsp90*, mientras que *hsp27* y *hsp10* mostraron una mayor activación frente a GenX, especialmente a concentraciones intermedias, observándose patrones compatibles con respuestas horméticas. A 28 °C se observó una mayor inducción de genes asociados a mecanismos de protección celular, especialmente *hsp10* y *hsp90*, lo que sugiere que el incremento térmico activa respuestas frente al estrés inducido por GenX. Sin embargo, en presencia de GenX, esta respuesta fue modulada de forma dependiente de la concentración, observándose en algunos genes una inhibición, como *hsp27* y *hsp70*. Además, las diferencias observadas entre controles indican que la temperatura por sí sola es capaz de modular la expresión de *hsp27*, *hsp70* y *fkbp39* relacionados con la respuesta al estrés. En conjunto, estos resultados sugieren una interacción compleja entre el estrés químico y térmico, donde la temperatura puede potenciar o modular negativamente las respuestas celulares inducidas por GenX, evidenciando posibles efectos sinérgicos y moduladores por la exposición simultánea a múltiples estresores ambientales.

ii) Detoxificación y respuesta a contaminantes

La exposición a contaminantes ambientales puede activar mecanismos celulares de detoxificación destinados a transformar, neutralizar y eliminar compuestos xenobióticos.

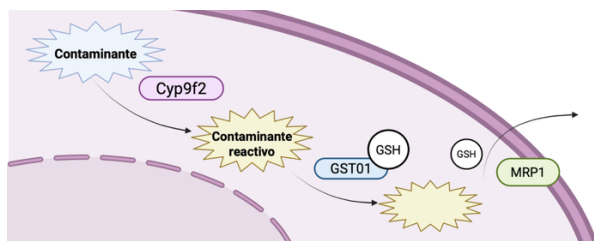


Figura 11. Esquema de la vía de detoxificación celular frente a contaminantes en *C. riparius*. La exposición a contaminantes induce su biotransformación a compuestos más reactivos mediante enzimas de fase I como Cyp9f2. Posteriormente, éstos son conjugados con glutatión (GSH) a través de enzimas de fase II como GSTO1, facilitando su detoxificación. Finalmente, los conjugados son transportados fuera de la célula mediante transportadores de fase III como MRP1, contribuyendo a la eliminación de xenobióticos. Imagen propia generada en BioRender.

La Figura 11 resume la respuesta celular de detoxificación. En la fase I, como el citocromo P450 (Cyp9f2), transforma el contaminante en metabolitos más reactivos y polares.³⁴ En la fase II, estos metabolitos reactivos se conjugan con el glutatión (GSH), mediante el glutatión S-transferasa omega 1 (GSTO1), reduciendo su reactividad y favoreciendo su eliminación.³⁵ Finalmente, en la fase III, los conjugados formados son transportados fuera de la célula mediante proteínas transportadoras de membrana como la Multidrug Resistance-associated Protein 1 (MRP1), evitando su acumulación intracelular y disminuyendo su potencial tóxico.³⁶

Los resultados mostraron que la expresión de *Cyp9f2* presenta una respuesta variable tras la exposición a GenX tanto a 20 °C como a 28 °C (Figura 12). A 20 °C se detectó un aumento de la expresión a 10^3 y 10^5 ng/L y una disminución a 10^4 ng/L. A 28 °C se observó una disminución en la expresión a 10^4 ng/L y un ligero incremento a las otras dos concentraciones. El control a 28 °C presentó niveles de expresión superiores respecto a 20 °C, sugiriendo que el incremento térmico induce la expresión de *Cyp9f2*. Además, se observaron diferencias significativas entre temperaturas a 10^4 y 10^5 ng/L, registrándose mayores niveles de expresión a 28 °C que a 20 °C. Estos resultados indican que el aumento de temperatura afecta directamente a los sistemas de detoxificación de fase I incluso en ausencia del contaminante, activando mecanismos celulares implicados en el metabolismo de xenobióticos y modulando posteriormente la respuesta frente a la exposición a GenX. Los citocromos P450 participan en el metabolismo de xenobióticos y pueden presentar respuestas complejas y no lineales dependiendo del contaminante y de las condiciones ambientales.^{22,37} Además, exposiciones a PFAS como GenX se han asociado con estrés oxidativo y alteraciones fisiológicas en organismos acuáticos.³⁸

La expresión de *gstO1* en larvas expuestas a GenX a 20 °C mostró un incremento significativo a 10^3 y 10^4 ng/L respecto al control y una reducción a 10^5 ng/L. A 28 °C no se observaron diferencias estadísticamente significativas, detectándose un aumento de la expresión a 10^3 y 10^4 ng/L (Figura 12). Las comparaciones entre temperaturas mostraron

diferencias significativas en el control y en las concentraciones de 10^3 ng/L y 10^4 ng/L, observándose una reducción de la expresión a 28 °C, lo que sugiere que el incremento térmico podría reducir la respuesta antioxidante mediada por GST. Las enzimas GST participan en la detoxificación de compuestos reactivos mediante su conjugación con glutatión.³⁵ La disminución observada a 28 °C y a concentraciones elevadas de GenX podría relacionarse con un desajuste de los sistemas de detoxificación bajo condiciones de mayor estrés fisiológico, tal y como se ha descrito previamente en organismos acuáticos expuestos a contaminantes y aumento de temperatura.^{4,39}

La expresión de *MRP1* mostró una inhibición a 20 °C en 10^3 y 10^4 ng/L, y un incremento significativo a 10^5 ng/L respecto al control (Figura 12). A 28 °C se observó una inhibición significativa a 10^3 ng/L respecto al control y una recuperación en 10^4 y 10^5 ng/L. El control a 28 °C presentó niveles de expresión superiores respecto al de 20 °C, sugiriendo que el incremento térmico podría activar *MRP1*. La comparación entre temperaturas reveló diferencias significativas a 10^3 ng/L, con menor expresión a 28 °C que a 20 °C. Sin embargo, esta diferencia disminuyó a 10^4 ng/L y prácticamente desapareció a 10^5 ng/L. Las proteínas MRP forman parte de la fase III de detoxificación y participan en la expulsión de metabolitos conjugados fuera de la célula.³⁶ El incremento observado a altas concentraciones de GenX sugiere la activación de mecanismos de exportación celular. Además, los resultados sugieren que el aumento de temperatura puede inhibir parcialmente la expresión de este gen a bajas concentraciones de GenX, mientras que bajo condiciones combinadas de mayor estrés térmico y químico se produciría una activación compensatoria de MRP1. Este tipo de respuestas adaptativas han sido descritas en organismos acuáticos expuestos a xenobióticos y estrés oxidativo.³⁹

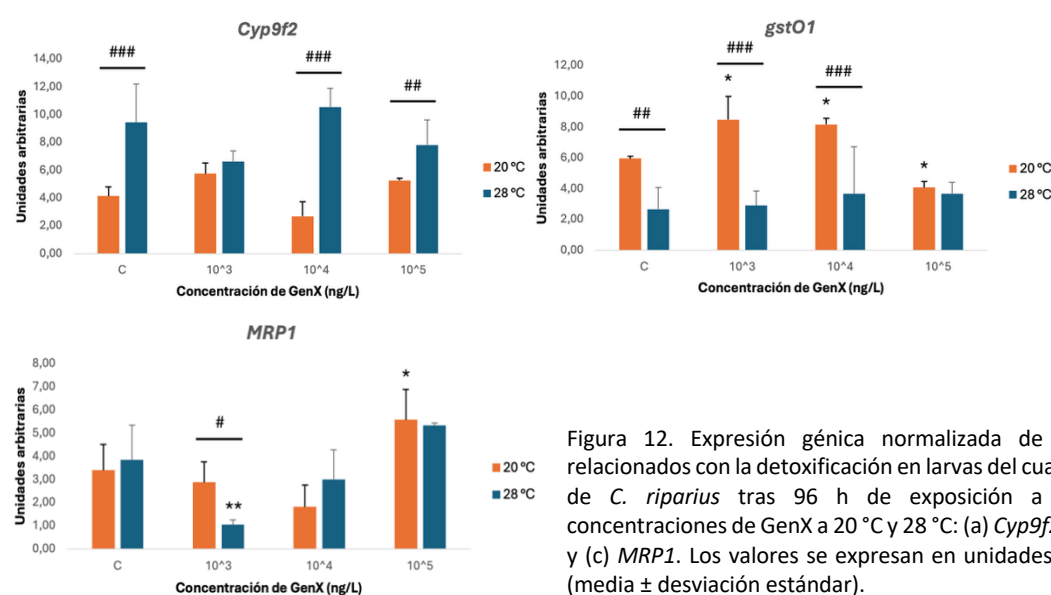


Figura 12. Expresión génica normalizada de los genes relacionados con la detoxificación en larvas del cuarto estadio de *C. riparius* tras 96 h de exposición a diferentes concentraciones de GenX a 20 °C y 28 °C: (a) *Cyp9f2*, (b) *gstO1* y (c) *MRP1*. Los valores se expresan en unidades arbitrarias (media $\pm$ desviación estándar).

En conclusión, los resultados obtenidos muestran que la exposición a GenX modula diferentes fases de la respuesta detoxificante en *C. riparius*, y que la temperatura influye sobre estos mecanismos. El aumento de la expresión de *Cyp9f2* a 28 °C, junto con la mayor expresión detectada a 10⁴ ng/L respecto a 28 °C, sugiere que el aumento térmico podría potenciar los mecanismos de detoxificación de fase I. En *gstO1*, a 20 °C se observó una activación de la expresión a 10³ y 10⁴ ng/L, seguida de una disminución a 10⁵ ng/L, que podría corresponder a una respuesta hormética asociada al agotamiento de la capacidad detoxificadora.⁴⁰ Sin embargo, a 28 °C los niveles de expresión fueron notablemente inferiores en comparación con el tratamiento a 20 °C indicando que el incremento térmico reduce la respuesta antioxidante y de conjugación mediada por GST. En el caso de *MRP1*, las diferencias observadas entre temperaturas dependen de la concentración de GenX, aunque el aumento de la expresión a altas concentraciones sugiere la activación de mecanismos de transporte y eliminación de compuestos tóxicos para mantener la homeostasis celular. Asimismo, el aumento de temperatura parece modular diferencialmente la expresión de *MRP1*, inhibiéndola a bajas concentraciones de GenX y activándola bajo condiciones combinadas de mayor estrés químico y térmico. En conjunto, estos resultados evidencian una interacción entre el estrés térmico y químico sobre los mecanismos celulares de defensa.

iii) Sistema endocrino y desarrollo

La exposición a contaminantes ambientales puede alterar los sistemas endocrinos de organismos acuáticos, interfiriendo en rutas hormonales implicadas en el desarrollo y la metamorfosis. En insectos, estos procesos están regulados por la interacción entre la ecdisona (20-hidroxiecdisona, 20-E) y la hormona juvenil (JH), cuya señalización controla la activación secuencial de genes implicados en la muda y la diferenciación.^{41,42}

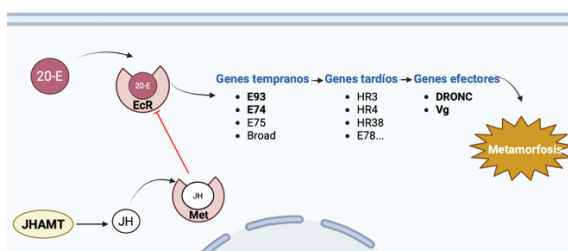


Figura 13. Esquema de la regulación endocrina del desarrollo y la metamorfosis en *C. riparius*. La hormona ecdisona (20-E) se une al receptor (EcR), activando una cascada transcripcional con la expresión de genes tempranos (*E93*, *E74*, *E75*, *Broad*), genes tardíos (*HR3*, *HR4*, *HR38*, *E78*) y genes efectores (*DRONC* y *Vg*), que conducen a la metamorfosis. La hormona juvenil (JH), cuya síntesis está regulada por la enzima JHAMT, actúa a través del receptor Met inhibiendo la acción de la ecdisona y modulando la transición metamórfica. Imagen propia generada en BioRender.

La Figura 13 representa de forma esquemática esta regulación endocrina. La unión de la ecdisona (20-E) a su receptor nuclear EcR/USP activa una cascada transcripcional que incluye genes tempranos como *E74* y *E93*, implicados en la remodelación celular y,

posteriormente, genes efectores, como *DRONC*, implicado en la apoptosis necesaria para la metamorfosis.⁴³ Por otro lado, la hormona juvenil (JH), cuya síntesis depende de la actividad de la enzima JHAMT, actúa a través del receptor Met, antagonizando la señalización de la ecdisona. Este mecanismo mantiene el estado larvario al inhibir la progresión hacia la metamorfosis y modular la respuesta a los pulsos de ecdisona.⁴⁴

Los resultados muestran una inhibición de la expresión de *EcR* tras la exposición a GenX a 20 °C especialmente a 10^4 y 10^5 ng/L respecto al control (Figura 14). Esta inhibición sugiere que GenX actúa como un disruptor endocrino interfiriendo en la señalización mediada por ecdisona, alterando rutas hormonales implicadas en el desarrollo y la metamorfosis.⁴⁵ A 28 °C se observó una reducción de la expresión significativa a 10^3 , 10^4 y 10^5 ng/L. El control a 28 °C presentó niveles de expresión significativamente superiores respecto al control a 20 °C, lo que sugiere que el incremento térmico induce la expresión de *EcR*, posiblemente por la aceleración de procesos metabólicos y muda mediados por ecdisona.^{22,42} La respuesta frente a GenX varió entre temperaturas. A 10^3 ng/L la expresión fue menor a 28 °C que a 20 °C, mientras que en 10^4 y 10^5 ng/L la expresión fue superior a 28 °C, lo que sugiere que GenX puede alterar la señalización endocrina mediada por ecdisona, mientras que el aumento de temperatura podría modular parcialmente esta respuesta. *EcR* es un receptor clave en la regulación del desarrollo y la metamorfosis en insectos, y diversos contaminantes ambientales pueden interferir en esta vía hormonal.^{42,46} Estudios previos sugieren que PFAS emergentes pueden alterar procesos de regulación génica y señalización endocrina en organismos acuáticos.¹³

La expresión de *E74* fue inhibida en todas las concentraciones de GenX estudiadas respecto al control, tanto a 20 °C como a 28 °C, observándose los niveles más bajos a 10^4 ng/L (Figura 14). Este comportamiento concuerda con los resultados obtenidos para *EcR* y refuerza la hipótesis de que GenX podría actuar como un disruptor endocrino capaz de alterar la señalización de ecdisona. A 28 °C la reducción fue mayor en las concentraciones intermedias, pero en 10^5 ng/L se observó una recuperación de la expresión. El control a 28 °C presentó niveles de expresión significativamente inferiores respecto al control a 20 °C, dando un patrón opuesto al observado para *EcR*. Del mismo modo, a 10^3 ng/L se detectaron niveles de expresión significativamente menores a 28 °C, indicando que la temperatura podría potenciar el efecto inhibitor de GenX sobre este gen. Sin embargo, en 10^5 ng/L la expresión fue significativamente mayor a 28 °C que a 20 °C, sugiriendo una recuperación parcial de la expresión bajo condiciones de estrés térmico. Este

comportamiento es coherente con la relación funcional existente entre ambos genes, ya que *E74* es un gen de respuesta temprana regulado por la activación del receptor EcR dentro de la cascada de señalización de ecdisona.^{42,43} Por tanto, la inhibición observada del EcR podría explicar la disminución de la expresión de *E74* detectada tras la exposición a GenX. Alteraciones similares en genes regulados por la ecdisona han sido descritas previamente tras la exposición a compuestos con actividad disruptora endocrina.^{45,46}

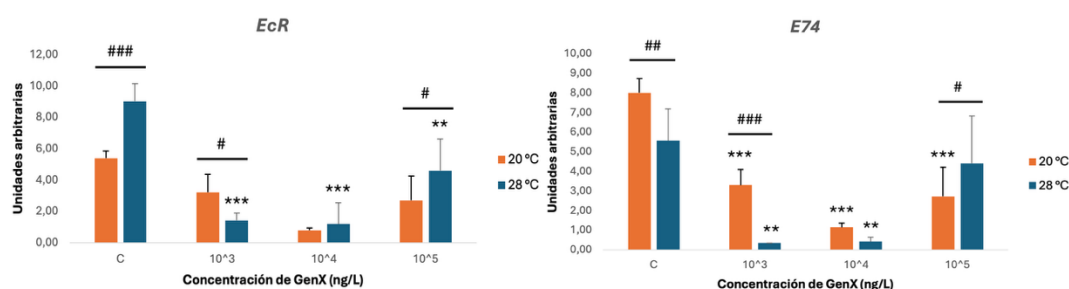


Figura 14. Expresión génica normalizada de los genes relacionados con el sistema endocrino en larvas del cuarto estadio de *C. riparius* tras 96 h de exposición a diferentes concentraciones de GenX a 20 °C y 28 °C: (a) *EcR* y (b) *E74*. Los valores se expresan en unidades arbitrarias (media $\pm$ desviación estándar).

Con respecto a *E93*, los resultados mostraron una disminución de su expresión a 10³ y 10⁴ ng/L de GenX tanto a 20 °C como a 28 °C respecto al control, mientras que a 10⁵ ng/L se observó un incremento de la expresión, especialmente a 20 °C (Figura 15). Este patrón sugiere una interferencia endocrina dependiente de la dosis, compatible con una respuesta hormética en genes regulados por *EcR*. El control a 28 °C presentó niveles de expresión superiores a 20 °C, con diferencias significativas entre temperaturas, lo que sugiere que el incremento térmico induce la expresión de *E93*. Sin embargo, en 10⁵ ng/L la expresión fue significativamente menor a 28 °C que a 20 °C, lo que indica que la temperatura podría modular parcialmente la respuesta inducida por GenX. *E93* es un gen regulado por ecdisona implicado en procesos de remodelación tisular y diferenciación celular durante la metamorfosis.⁴⁷ Se ha descrito que contaminantes ambientales y compuestos con actividad disruptora endocrina pueden modificar la expresión de genes asociados a la señalización hormonal y al desarrollo en insectos.^{44,46}

En el caso de *DRONC*, a 20 °C los niveles de expresión permanecieron relativamente estables entre tratamientos respecto al control. A 28 °C se observó una mayor expresión del gen, especialmente a 10⁴ y 10⁵ ng/L (Figura 15). Además, el control a 28 °C presentó niveles de expresión superiores respecto al control a 20 °C y se observaron diferencias significativas en las concentraciones de 10⁴ ng/L y 10⁵ ng/L, donde la expresión fue mayor a 28 °C. *DRONC* participa en procesos apoptóticos asociados a la metamorfosis, permitiendo la eliminación de tejidos larvarios y la remodelación celular necesaria para la transición a estadios posteriores.⁴⁸ El aumento de la expresión a 28 °C sugiere que el

estrés térmico combinado con la exposición a GenX podría favorecer la activación de mecanismos apoptóticos en *C. riparius*.

La expresión de *Vg* mostró un patrón diferencial entre temperaturas, con valores generalmente más elevados a 20 °C y una disminución global a 28 °C (Figura 15). A 20 °C se observó un incremento significativo a 10^3 ng/L respecto al control, mientras que a 28 °C los niveles de expresión permanecieron similares al control. Además, el control y todas las concentraciones a 28 °C presentaron niveles de expresión significativamente inferiores que, a 20 °C, sugiriendo que el incremento térmico reduce la expresión de *Vg*. Estos resultados indican que el estrés térmico podría modular a la baja la respuesta endocrina inducida por GenX. Dado que *Vg* es un biomarcador ampliamente utilizado en estudios de disrupción endocrina, implicado en la maduración ovárica y la provisión de reservas energéticas al embrión, su disminución podría indicar una desviación de recursos hacia mecanismos de supervivencia bajo condiciones de estrés térmico.^{49,50} Asimismo, la inhibición observada a concentraciones intermedias sugiere una respuesta no monótonica compatible con mecanismos de disrupción endocrina y/o con la activación de respuestas compensatorias a concentraciones elevadas.^{4,46}

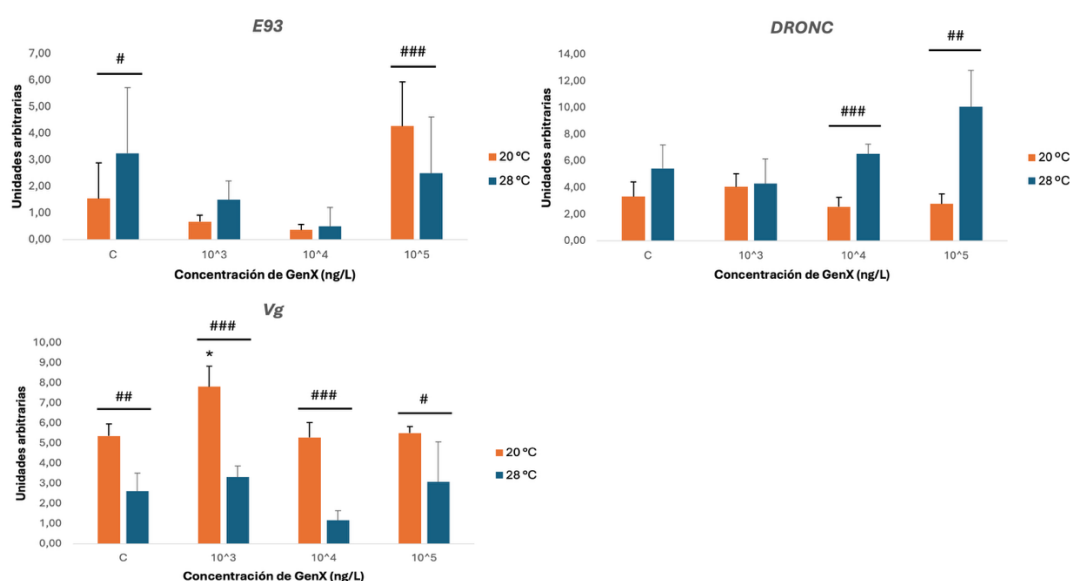


Figura 15. Expresión génica normalizada de los genes relacionados con el sistema endocrino en larvas del cuarto estadio de *C. riparius* tras 96 h de exposición a diferentes concentraciones de GenX a 20 °C y 28 °C: (a) *E93*, (b) *DRONC* y (c) *Vg*. Los valores se expresan en unidades arbitrarias (media $\pm$ desviación estándar).

La expresión de *JHAMT* y *Met* mostró un patrón similar entre temperaturas, evidenciando una influencia del estrés térmico sobre la vía de la hormona juvenil (Figura 16). A 20 °C, ambos genes presentaron niveles de expresión bajos y estables, con únicamente un incremento significativo de *JHAMT* en 10^3 ng/L. Sin embargo, a 28 °C los controles mostraron niveles de expresión significativamente superiores respecto a 20 °C, sugiriendo

que el incremento térmico induce la activación de esta vía. En ambos genes se observó una disminución de la expresión en las concentraciones intermedias de GenX, seguida de una sobreexpresión a 10^5 ng/L. Además, se detectaron diferencias significativas entre temperaturas a 10^3 y 10^5 ng/L para *JHAMT* y a 10^5 ng/L para *Met*, registrándose una menor expresión de *JHAMT* a 28 °C a 10^3 ng/L y una sobreexpresión a 10^5 ng/L para ambos genes. Estos resultados sugieren que el estrés térmico combinado con la exposición a altas concentraciones de GenX activa la señalización de la hormona juvenil, esto podría suponer el mantenimiento del estado larvario y afectar procesos de desarrollo y metamorfosis, pero se necesitan más estudios para confirmarlo.^{42,44}

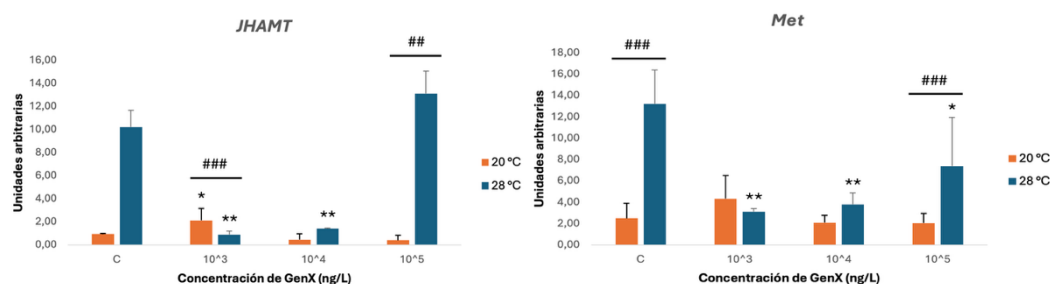


Figura 16. Expresión génica normalizada de los genes relacionados con el sistema endocrino en larvas del cuarto estadio de *C. riparius* tras 96 h de exposición a diferentes concentraciones de GenX a 20 °C y 28 °C: (a) *JHAMT* y (b) *Met*. Los valores se expresan en unidades arbitrarias (media $\pm$ desviación estándar).

En conclusión, los resultados obtenidos evidencian que la exposición a GenX altera la expresión de genes implicados en el sistema endocrino de *C. riparius*. Los genes asociados a la señalización de la ecdisona (*EcR*, *E74* y *E93*) son inhibidos, especialmente a concentraciones intermedias, lo que sugiere una alteración de las rutas endocrinas y refuerza la hipótesis de que GenX actúa como un disruptor endocrino en *C. riparius*. Por otro lado, el incremento de temperatura indujo la expresión de genes asociados con la vía de la ecdisona y la hormona juvenil, como *EcR*, *E93*, *JHAMT*, *Met* y *DRONC*, sugiriendo una activación de los procesos asociados al desarrollo, la muda y la metamorfosis por el aumento de temperatura. Sin embargo, en presencia de GenX, esta respuesta térmica se moduló de forma dependiente de la concentración, observándose en *E74*, *E93*, *Vg*, *JHAMT* y *Met* una inhibición más marcada a concentraciones intermedias y respuestas compensatorias a concentraciones elevadas, compatibles con patrones no monotónicos característicos de mecanismos de disrupción endocrina.

iv) Reparación del ADN y apoptosis

La exposición a contaminantes ambientales puede provocar daño en el ADN, generando roturas de cadena simple (SSB) y roturas de doble cadena (DSB), que comprometen la estabilidad genómica celular. Frente a este daño, las células activan el sistema de respuesta al daño en el ADN (DNA Damage Response, DDR), una red

compleja de señalización que coordina la detección del daño, la activación de mecanismos de reparación y, en caso de daño irreparable, la inducción de la apoptosis (Figura 17).⁵¹

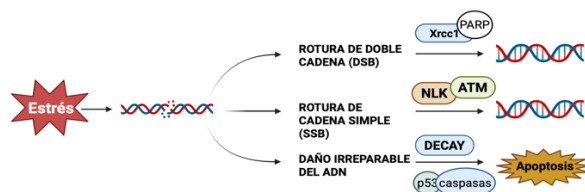


Figura 17. Esquema de la respuesta celular al daño en el ADN en *C. riparius*. La exposición a factores de estrés puede inducir roturas en el ADN, tanto de cadena simple (SSB) como de doble cadena (DSB). Las roturas de cadena simple son detectadas por PARP y reparadas mediante proteínas como XRCC1, mientras que las roturas de doble cadena activan rutas de señalización mediadas por ATM y NLK, implicadas en la reparación del ADN. Cuando el daño es excesivo o irreparable, se activa la vía apoptótica a través de reguladores como p53, caspasas y proteínas como DEKAY, conduciendo a la muerte celular programada. Imagen propia generada en BioRender.

Las roturas de cadena simple (SSB) son reparadas mediante la reparación por escisión de bases (BER), donde la proteína XRCC1 actúa como plataforma de ensamblaje de los complejos de reparación, junto a proteínas como PARP.⁵² Por otro lado, las roturas de doble cadena (DSB), uno de los daños más graves, activan proteínas sensoras como ATM y moduladores como NLK, implicadas en la reparación del ADN y la apoptosis.⁵³ Cuando el daño en el ADN es excesivo o irreparable, se activan mecanismos de muerte celular programada mediante proteínas reguladoras como p53 y caspasas efectoras, como DEKAY, que ejecutan la apoptosis.⁵⁴ En suma, este sistema mantiene la integridad celular mediante la reparación del ADN o la eliminación de células dañadas por apoptosis.⁵⁵

Los resultados muestran que la expresión de *Xrcc1* a 20 °C aumenta a 10³ ng/L y disminuyó a 10⁴ y 10⁵ ng/L (Figura 18). A 28 °C se detectó una inhibición significativa a 10³ y 10⁴ ng/L, mientras que se aumentó la expresión en 10⁵ ng/L respecto al control. En el control a 28 °C se inhibe la expresión respecto al control a 20 °C, sugiriendo que el incremento térmico inhibe su expresión. Las larvas expuestas a GenX mostraron menores niveles de expresión a 28 °C que a 20 °C, con diferencias significativas a 10⁴ y 10⁵ ng/L. Este patrón podría reflejar una activación inicial de los mecanismos de reparación del ADN frente al daño inducido por GenX que se ven reducidos por agotamiento. XRCC1 participa en la reparación de roturas de cadena simple y es reclutada en respuesta a daño genético.⁵² Estos resultados concuerdan con estudios que describen estrés oxidativo y daño en el ADN tras exposición a GenX.⁵⁶

Por su parte, NLK fue inhibida por GenX a 20 °C, significativamente a 10⁴ ng/L, con respecto al control (Figura 18). A 28 °C se observó una inhibición significativa a 10³ y 10⁴ ng/L, y un aumento en la expresión en 10⁵ ng/L. El control a 28 °C presentó niveles de expresión superiores que el de 20 °C, sugiriendo una activación del gen inducida por la temperatura. A 10³ ng/L, la expresión fue significativamente mayor a 28 °C que a 20

°C, al igual que las demás concentraciones. Estos resultados sugieren que el aumento térmico induce la expresión de *NLK* y que bajas concentraciones modulan a la baja su expresión, mientras que a altas concentraciones y calor se activa su expresión. La activación de proteínas relacionadas con la respuesta a daño en el ADN ha sido descrita bajo condiciones de estrés oxidativo y exposición a contaminantes ambientales.⁵³

En relación con *DECAY*, a 20 °C se observó una disminución de la expresión respecto al control, significativa a 10^4 y 10^5 ng/L (Figura 17). A 28 °C se observa una inhibición significativa a 10^4 ng/L respecto al control. Además, el control y las larvas expuestas a GenX presentaron menores niveles de expresión a 28 °C que a 20 °C, observándose diferencias significativas entre temperaturas en todas las concentraciones. Los resultados indican que la expresión de *DECAY* fue modulada negativamente por efecto de GenX y temperatura. Dado que *DECAY* participa en procesos apoptóticos, este patrón podría indicar diferencias en la regulación de la apoptosis dependiendo de la temperatura.⁵⁴

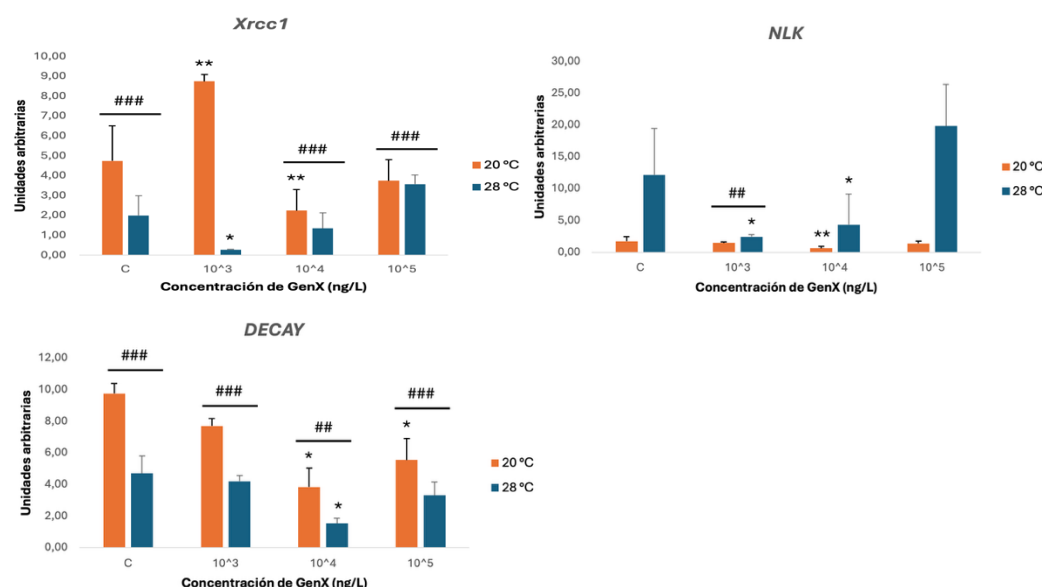


Figura 18. Expresión génica normalizada de los genes relacionados con el sistema de reparación del ADN y apoptosis en larvas del cuarto estadio de *C. riparius* tras 96 h de exposición a diferentes concentraciones de GenX a 20 °C y 28 °C: (a) *Xrcc1*, (b) *NLK* y (c) *DECAY*. Los valores se expresan en unidades arbitrarias (media $\pm$ desviación estándar).

En conclusión, los resultados obtenidos muestran que GenX modula genes relacionados con la reparación del ADN y apoptosis en *C. riparius*, observándose además una clara influencia de la temperatura. *Xrcc1* presentó una activación inicial seguida de una inhibición a concentraciones elevadas, lo que sugiere un posible agotamiento de los mecanismos de reparación del ADN. Por otro lado, el incremento térmico indujo la expresión de *NLK*, especialmente a altas concentraciones de GenX, mientras que *DECAY* mostró una inhibición general más acusada a 28 °C. En conjunto, estos resultados indican

que el estrés térmico modifica la respuesta celular frente al daño inducido por GenX, afectando procesos asociados con la reparación del ADN y la regulación de la apoptosis.

6. VINCULACIÓN DEL ESTUDIO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE (ODS)

El presente Trabajo Fin de Grado (TFG) se relaciona con diferentes Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030 de las Naciones Unidas. En primer lugar, se asocia al ODS 6: Agua limpia y saneamiento, concretamente a la mejora de la calidad del agua por la reducción de la contaminación y la liberación de sustancias químicas peligrosas. La evaluación de los efectos ecotoxicológicos de GenX en organismos acuáticos contribuye al conocimiento sobre el impacto ambiental de los PFAS emergentes en ecosistemas de agua dulce. Asimismo, se relaciona con el ODS 13: Acción por el clima, pues analiza cómo el incremento de temperatura asociado al cambio climático puede modificar la respuesta biológica frente a contaminantes ambientales. La combinación de estrés térmico y contaminación química representa un escenario cada vez más frecuente en los ecosistemas acuáticos. Además, se vincula con el ODS 14: Vida submarina, centrado en la conservación de los ecosistemas acuáticos pues *C. riparius* constituye una especie modelo en ecotoxicología para evaluar la calidad ambiental y el impacto de contaminantes. En suma, los resultados aportan información sobre los efectos combinados de contaminantes emergentes y cambio climático, contribuyendo al desarrollo de estrategias de evaluación y protección ambiental más sostenibles.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que GenX ejerce efectos ecotoxicológicos y moleculares en larvas de *C. riparius*, alterando procesos relacionados con la respuesta al estrés celular, la detoxificación, la reparación del ADN y, especialmente, la regulación endocrina. Además, el incremento de temperatura moduló estas respuestas y potenció los efectos del contaminante, evidenciando que el estrés térmico asociado al cambio climático puede incrementar la sensibilidad de los organismos acuáticos frente a contaminantes emergentes como GenX.

1. El análisis del pH del medio de exposición mostró que las diferentes concentraciones de GenX no produjeron alteraciones marcadas en las condiciones fisicoquímicas del ensayo, indicando que los efectos observados en las larvas de *C. riparius* se deben principalmente a la acción del contaminante o de la temperatura o de la combinación de ambos y no a cambios del pH del medio.

2. La exposición a GenX durante 96 horas no produjo una elevada mortalidad en larvas de *C. riparius*. Sin embargo, el incremento de temperatura modificó la sensibilidad al contaminante, sugiriendo que el estrés térmico puede actuar como un factor modulador de la respuesta ecotoxicológica.
3. Los datos obtenidos permiten concluir que GenX ejerce un impacto significativo sobre la fisiología molecular de *C. riparius*, afectando de forma integrada la respuesta al estrés celular, la detoxificación, la reparación del ADN y la regulación endocrina. La alteración de genes implicados en la señalización hormonal, la homeostasis proteica y la integridad genómica indica que GenX actúa como un estresor multifuncional capaz de comprometer procesos esenciales para el desarrollo y la supervivencia del organismo. Asimismo, la inhibición de genes clave de la vía de ecdisona respalda la hipótesis de que GenX actúa como un disruptor endocrino.
4. El aumento de temperatura indujo cambios significativos en la expresión génica, promoviendo la activación de genes relacionados con la respuesta al estrés, la regulación endocrina y los procesos de detoxificación, mientras que reprimió genes asociados con el mantenimiento celular, la reparación del ADN y la reproducción. En conjunto, estos resultados sugieren que el incremento térmico altera la homeostasis fisiológica del organismo y desencadena mecanismos de adaptación frente al estrés ambiental.
5. La interacción entre GenX y el aumento de temperatura intensificó la alteración de procesos celulares esenciales, especialmente aquellos relacionados con la regulación endocrina y la metamorfosis. En conjunto, estos resultados sugieren que el estrés térmico incrementa el impacto molecular de GenX y puede aumentar el riesgo para organismos acuáticos expuestos a escenarios de cambio climático.

En conjunto, los resultados evidencian que GenX actúa como un disruptor endocrino en *C. riparius* y que el aumento de temperatura asociado al cambio climático puede intensificar sus efectos moleculares y ecotoxicológicos en organismos acuáticos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Bashir, I.; Lone, F. A.; Bhat, R. A.; Mir, S. A.; Dar, Z. A.; Dar, S. A. Concerns and Threats of Contamination on Aquatic Ecosystems. In *Bioremediation and Biotechnology: Sustainable Approaches to Pollution Degradation*; Hakeem, K. R., Bhat, R. A., Qadri, H., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2020; pp 1–26. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35691-0_1.

- (2) Amoatey, P.; Baawain, M. S. Effects of Pollution on Freshwater Aquatic Organisms. *Water Environment Research* **2019**, *91* (10), 1272–1287. <https://doi.org/10.1002/wer.1221>.
- (3) Puri, M.; Gandhi, K.; Kumar, M. S. Emerging Environmental Contaminants: A Global Perspective on Policies and Regulations. *J Environ Manage* **2023**, *332*, 117344. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117344>.
- (4) Noyes, P. D.; McElwee, M. K.; Miller, H. D.; Clark, B. W.; Van Tiem, L. A.; Walcott, K. C.; Erwin, K. N.; Levin, E. D. The Toxicology of Climate Change: Environmental Contaminants in a Warming World. *Environ Int* **2009**, *35* (6), 971–986. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.02.006>.
- (5) Intergovernmental Panel On Climate Change (Ipcc). *Climate Change 2021 – The Physical Science Basis: Working Group I Contribution to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, 1st ed.; Cambridge University Press, 2023. <https://doi.org/10.1017/9781009157896>.
- (6) Wang, Z.; DeWitt, J. C.; Higgins, C. P.; Cousins, I. T. A Never-Ending Story of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs)? *Environ Sci Technol* **2017**, *51* (5), 2508–2518. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04806>.
- (7) Buck, R. C.; Franklin, J.; Berger, U.; Conder, J. M.; Cousins, I. T.; de Voogt, P.; Jensen, A. A.; Kannan, K.; Mabury, S. A.; van Leeuwen, S. P. Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances in the Environment: Terminology, Classification, and Origins. *Integrated Environmental Assessment and Management* **2011**, *7* (4), 513–541. <https://doi.org/10.1002/ieam.258>.
- (8) Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico,. *Los Químicos Que Nos Rodean: PFAS*; Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, 2022.
- (9) Sunderland, E. M.; Hu, X. C.; Dassuncao, C.; Tokranov, A. K.; Wagner, C. C.; Allen, J. G. A Review of the Pathways of Human Exposure to Poly- and Perfluoroalkyl Substances (PFASs) and Present Understanding of Health Effects. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **2019**, *29* (2), 131–147. <https://doi.org/10.1038/s41370-018-0094-1>.
- (10) Hopkins, Z. R.; Sun, M.; DeWitt, J. C.; Knappe, D. R. U. Recently Detected Drinking Water Contaminants: GenX and Other Per- and Polyfluoroalkyl Ether Acids. *Journal AWWA* **2018**, *110* (7), 13–28. <https://doi.org/10.1002/awwa.1073>.

- (11) U.S. Environmental Protection Agency. *Human Health Toxicity Values for Hexafluoropropylene Oxide (HFPO) Dimer Acid and Its Ammonium Salt (GenX Chemicals)*; Informe EPA 822R-21-010; U.S. Environmental Protection Agency (EPA): Washington, DC, 2021.
- (12) Sun, M.; Arevalo, E.; Strynar, M.; Lindstrom, A.; Richardson, M.; Kearns, B.; Pickett, A.; Smith, C.; Knappe, D. R. U. Legacy and Emerging Perfluoroalkyl Substances Are Important Drinking Water Contaminants in the Cape Fear River Watershed of North Carolina. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2016**, 3 (12), 415–419. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.6b00398>.
- (13) Cheng, C.; Zhu, X.; Li, J.; Ornelas-Soto, N.; Wang, Y. Emerging PFAS Alternatives: Unveiling Environmental Fates and Ecological Risks. *Energy & Environmental Sustainability* **2025**, 1 (3), 100041. <https://doi.org/10.1016/j.eesus.2025.100041>.
- (14) Karima, Z. Chironomidae: Biology, Ecology and Systematics. In *The Wonders of Diptera - Characteristics, Diversity, and Significance for the World's Ecosystems*; IntechOpen, 2021. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95577>.
- (15) OECD. *Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment*; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2; OECD, 2010. <https://doi.org/10.1787/9789264090910-en>.
- (16) U.S. Environmental Protection Agency. *Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates (2nd Ed.)*; EPA/600/R-99/064; 2000.
- (17) Armitage, P. D.; Pinder, L. C.; Cranston, P. *The Chironomidae: Biology and Ecology of Non-Biting Midges*; Springer Science & Business Media, 1994.
- (18) Klomp, J.; Athy, D.; Kwan, C. W.; Bloch, N. I.; Sandmann, T.; Lemke, S.; Schmidt-Ott, U. A Cysteine-Clamp Gene Drives Embryo Polarity in the Midge *Chironomus*. *Science* **2015**, 348 (6238), 1040–1042. <https://doi.org/10.1126/science.aaa7105>.
- (19) Weltje, L.; Bruns, E. *The Chironomid Full Life-Cycle Test: Validation Report*; OECD, 2009.
- (20) Crespo, M. J. U. Análisis de supervivencia de *Chironomus riparius* expuesto al disruptor endocrino BPA (Bisfenol-A). Máster, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), 2017. <https://oai.e-spacio.uned.es/server/api/core/bitstreams/2e770b2d-45b6-439c-a67e-11e68cff2391/content>.

- (21) OECD. Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2* **2023**. <https://doi.org/10.1787/9789264070264-en>.
- (22) Holmstrup, M.; Bindesbøl, A.-M.; Oostingh, G. J.; Duschl, A.; Scheil, V.; Köhler, H.-R.; Loureiro, S.; Soares, A. M. V. M.; Ferreira, A. L. G.; Kienle, C.; Gerhardt, A.; Laskowski, R.; Kramarz, P. E.; Bayley, M.; Svendsen, C.; Spurgeon, D. J. Interactions between Effects of Environmental Chemicals and Natural Stressors: A Review. *Sci Total Environ* **2010**, *408* (18), 3746–3762. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.067>.
- (23) Feder, M. E.; Hofmann, G. E. Heat-Shock Proteins, Molecular Chaperones, and the Stress Response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annu Rev Physiol* **1999**, *61*, 243–282. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243>.
- (24) Sørensen, J. G.; Kristensen, T. N.; Loeschke, V. The Evolutionary and Ecological Role of Heat Shock Proteins. *Ecology Letters* **2003**, *6* (11), 1025–1037. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00528.x>.
- (25) Hartl, F. U.; Bracher, A.; Hayer-Hartl, M. Molecular Chaperones in Protein Folding and Proteostasis. *Nature* **2011**, *475* (7356), 324–332. <https://doi.org/10.1038/nature10317>.
- (26) Tomanek, L. Variation in the Heat Shock Response and Its Implication for Predicting the Effect of Global Climate Change on Species' Biogeographical Distribution Ranges and Metabolic Costs. *J Exp Biol* **2010**, *213* (6), 971–979. <https://doi.org/10.1242/jeb.038034>.
- (27) Garrido, C.; Brunet, M.; Didelot, C.; Zermati, Y.; Schmitt, E.; Kroemer, G. Heat Shock Proteins 27 and 70: Anti-Apoptotic Proteins with Tumorigenic Properties. *Cell Cycle* **2006**, *5* (22), 2592–2601. <https://doi.org/10.4161/cc.5.22.3448>.
- (28) Taipale, M.; Jarosz, D. F.; Lindquist, S. HSP90 at the Hub of Protein Homeostasis: Emerging Mechanistic Insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11* (7), 515–528. <https://doi.org/10.1038/nrm2918>.
- (29) Kang, C. B.; Hong, Y.; Dhe-Paganon, S.; Yoon, H. S. FKBP Family Proteins: Immunophilins with Versatile Biological Functions. *Neurosignals* **2008**, *16* (4), 318–325. <https://doi.org/10.1159/000123041>.
- (30) Mattson, M. P. Hormesis Defined. *Ageing Res Rev* **2008**, *7* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007>.

- (31) de Paz, P.; Morales, M.; Folgar, R.; Martinez-Guitarte, J.-L.; Morcillo, G. Characterization of the Small Heat Shock Protein Hsp27 Gene in *Chironomus riparius* (Diptera) and Its Expression Profile in Response to Temperature Changes and Xenobiotic Exposures. *Cell stress & chaperones* **2013**, *19*, 529–540. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0479-y>.
- (32) Park, K.; Kim, W.-S.; Kwak, I.-S. Effects of Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate on Transcriptional Expression of Cellular Protection-Related HSP60 and HSP67B2 Genes in the Mud Crab *Macrophthalmus Japonicus*. *Applied Sciences* **2020**, *10* (8), 2766. <https://doi.org/10.3390/app10082766>.
- (33) Wang, X.; Chen, M.; Zhou, J.; Zhang, X. HSP27, 70 and 90, Anti-Apoptotic Proteins, in Clinical Cancer Therapy (Review). *International Journal of Oncology* **2014**, *45* (1), 18–30. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2399>.
- (34) Guengerich, F. P. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chem Res Toxicol* **2008**, *21* (1), 70–83. <https://doi.org/10.1021/tx700079z>.
- (35) Hayes, J. D.; Flanagan, J. U.; Jowsey, I. R. Glutathione Transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2005**, *45*, 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>.
- (36) Leslie, E. M.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. Multidrug Resistance Proteins: Role of P-Glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in Tissue Defense. *Toxicol Appl Pharmacol* **2005**, *204* (3), 216–237. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.012>.
- (37) Snyder, M. J. Cytochrome P450 Enzymes in Aquatic Invertebrates: Recent Advances and Future Directions. *Aquat Toxicol* **2000**, *48* (4), 529–547. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(00\)00085-0](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(00)00085-0).
- (38) Zhang, J.; Zhang, S.; Lu, C.; Wang, X.; Du, Z.; Wang, J.; Li, B.; Wang, J.; Zhu, L. Comparison of the Combined Toxicity of PFOA and Emerging Alternatives: A Comprehensive Evaluation of Oxidative Damage, Apoptosis and Immunotoxicity in Embryonic and Adult Zebrafish. *Water Research* **2025**, *273*, 123028. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.123028>.
- (39) Lushchak, V. I. Environmentally Induced Oxidative Stress in Aquatic Animals. *Aquat Toxicol* **2011**, *101* (1), 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>.
- (40) Calabrese, E. J. Hormesis: Why It Is Important to Toxicology and Toxicologists. *Environ Toxicol Chem* **2008**, *27* (7), 1451–1474. <https://doi.org/10.1897/07-541>.

- (41) Riddiford, L. Hormones and Drosophila Development. In *Hormones and Drosophila Development*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993.
- (42) Gilbert, L. I.; Rybczynski, R.; Warren, J. T. Control and Biochemical Nature of the Ecdysteroidogenic Pathway. *Annual Review of Entomology* **2002**, *47* (Volume 47, 2002), 883–916. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145302>.
- (43) Thummel, C. S. Molecular Mechanisms of Developmental Timing in C. Elegans and Drosophila. *Dev Cell* **2001**, *1* (4), 453–465. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(01\)00060-0](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(01)00060-0).
- (44) Jindra, M.; Palli, S. R.; Riddiford, L. M. The Juvenile Hormone Signaling Pathway in Insect Development. *Annu Rev Entomol* **2013**, *58*, 181–204. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153700>.
- (45) Song, Y.; Villeneuve, D. L.; Toyota, K.; Iguchi, T.; Tollefsen, K. E. Ecdysone Receptor Agonism Leading to Lethal Molting Disruption in Arthropods: Review and Adverse Outcome Pathway Development. *Environ Sci Technol* **2017**, *51* (8), 4142–4157. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00480>.
- (46) Diamanti-Kandarakis, E.; Bourguignon, J.-P.; Giudice, L. C.; Hauser, R.; Prins, G. S.; Soto, A. M.; Zoeller, R. T.; Gore, A. C. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev* **2009**, *30* (4), 293–342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>.
- (47) Ureña, E.; Manjón, C.; Franch-Marro, X.; Martín, D. Transcription Factor E93 Specifies Adult Metamorphosis in Hemimetabolous and Holometabolous Insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111* (19), 7024–7029. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401478111>.
- (48) Meier, P.; Finch, A.; Evan, G. Apoptosis in Development. *Nature* **2000**, *407* (6805), 796–801. <https://doi.org/10.1038/35037734>.
- (49) Sumpter, J. P.; Jobling, S. Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. *Environ Health Perspect* **1995**, *103* (Suppl 7), 173–178. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103s7173>.
- (50) Paul, S.; Keshan, B. Ovarian Development and Vitellogenin Gene Expression under Heat Stress in Silkworm, Bombyx Mori. *Psyche: A Journal of Entomology* **2016**, *2016*.
- (51) Jackson, S. P.; Bartek, J. The DNA-Damage Response in Human Biology and Disease. *Nature* **2009**, *461* (7267), 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>.

- (52) Caldecott, K. W. XRCC1 and DNA Strand Break Repair. *DNA Repair (Amst)* **2003**, 2 (9), 955–969. [https://doi.org/10.1016/s1568-7864\(03\)00118-6](https://doi.org/10.1016/s1568-7864(03)00118-6).
- (53) Shiloh, Y. ATM and Related Protein Kinases: Safeguarding Genome Integrity. *Nat Rev Cancer* **2003**, 3 (3), 155–168. <https://doi.org/10.1038/nrc1011>.
- (54) Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* **2007**, 35 (4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- (55) Sancar, A.; Lindsey-Boltz, L. A.; Unsal-Kaçmaz, K.; Linn, S. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annu Rev Biochem* **2004**, 73, 39–85. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>.
- (56) Yoo, H. J.; Pyo, M. C.; Park, Y.; Kim, B. Y.; Lee, K.-W. Hexafluoropropylene Oxide Dimer Acid (GenX) Exposure Induces Apoptosis in HepG2 Cells. *Heliyon* **2021**, 7 (11), e08272. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08272>.
- (57) Martínez-Paz, P.; Morales, M.; Martínez-Guitarte, J. L.; Morcillo, G. Characterization of a Cytochrome P450 Gene (*CYP4G*) and Modulation under Different Exposures to Xenobiotics (Tributyltin, Nonylphenol, Bisphenol A) in *Chironomus riparius* Aquatic Larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **2012**, 155 (2), 333–343. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.10.001>.
- (58) Martínez-Guitarte, J.-L. Transcriptional Activity of Detoxification Genes Is Altered by Ultraviolet Filters in *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2018**, 149, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.017>.
- (59) Muñoz-González, A.-B.; Martínez-Guitarte, J.-L. Combined Effects of Benzophenone-3 and Temperature on Gene Expression and Enzymatic Activity in the Aquatic Larvae *Chironomus riparius*. *Science of The Total Environment* **2020**, 698, 134292. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134292>.
- (60) Carrasco-Navarro, V.; Muñoz-González, A.-B.; Sorvari, J.; Martínez-Guitarte, J.-L. Altered Gene Expression in *Chironomus riparius* (Insecta) in Response to Tire Rubber and Polystyrene Microplastics. *Environ Pollut* **2021**, 285, 117462. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117462>.
- (61) Morales, M.; Martínez-Paz, P.; Ozáez, I.; Martínez-Guitarte, J. L.; Morcillo, G. DNA Damage and Transcriptional Changes Induced by Tributyltin (TBT) after Short in Vivo Exposures of *Chironomus riparius* (Diptera) Larvae. *Comp Biochem*

- Physiol C Toxicol Pharmacol* **2013**, *158* (2), 57–63.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.05.005>.
- (62) Martín-Folgar, R.; Martínez-Guitarte, J.-L. Cadmium Alters the Expression of Small Heat Shock Protein Genes in the Aquatic Midge *Chironomus riparius*. *Chemosphere* **2017**, *169*, 485–492.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.067>.
- (63) Caballero-Carretero, P.; Carrasco-Navarro, V.; Kukkonen, J.; Martínez-Guitarte, J.-L. Gene Expression Analysis of *Chironomus riparius* in Response to Acute Exposure to Tire Rubber Microparticles and Leachates. Social Science Research Network: Rochester, NY August 8, 2023. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4526950>.
- (64) Aquilino, M.; Sánchez-Argüello, P.; Martínez-Guitarte, J.-L. Genotoxic Effects of Vinclozolin on the Aquatic Insect *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Environmental Pollution* **2018**, *232*, 563–570.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.088>.
- (65) Martín-Folgar, R.; Martínez-Guitarte, J.-L. Effects of Single and Mixture Exposure of Cadmium and Copper in Apoptosis and Immune Related Genes at Transcriptional Level on the Midge *Chironomus riparius* Meigen (Diptera, Chironomidae). *Science of The Total Environment* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.364>.
- (66) Kalman, J.; Valcárcel-Rivera, Y.; Martínez-Guitarte, J. L. Molecular Response of *Chironomus riparius* to Antibiotics. *Current Research in Toxicology* **2025**, *8*, 100239. <https://doi.org/10.1016/j.crttox.2025.100239>.
- (67) Muñoz-González, A.-B.; Novo, M.; Martínez-Guitarte, J.-L. Persistent Pesticides: Effects of Endosulfan at the Molecular Level on the Aquatic Invertebrate *Chironomus riparius*. *Environ Sci Pollut Res* **2021**, *28* (24), 31431–31446.
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-12669-4>.
- (68) Herrero, Ó.; Aquilino, M.; Sánchez-Argüello, P.; Planelló, R. The BPA-Substitute Bisphenol S Alters the Transcription of Genes Related to Endocrine, Stress Response and Biotransformation Pathways in the Aquatic Midge *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *PLoS One* **2018**, *13* (2), e0193387.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193387>.

9. ANEXOS

9.1 Índice de abreviaturas

Abreviatura	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AEI	Agencia Estatal de Investigación
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
BER	Reparación por escisión de bases
C. riparius	<i>Chironomus riparius</i>
CFX96	CFX96 Real-Time PCR System
CYP	Citocromo P450
Cyp9f2	Citocromo P450 9f2
DDR	DNA Damage Response
DECAY	Caspasa efectora implicada en apoptosis
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSB	Rotura de doble cadena
DRONC	Death regulator Nedd2-like caspase
DTT	Ditiotreitol
E74	Ecdysone-induced protein 74EF
E93	Ecdysone-induced protein 93F
EcR	Receptor de ecdisona
EvaGreen®	Fluoróforo intercalante para RT-qPCR
FKBP39	FK506-binding protein 39

Abreviatura	Significado
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GenX	Ácido de dímero de óxido de hexafluoropropileno (HFPO-DA)
GSH	Glutación
gstO1	Glutación S-transferasa omega 1
HFPO-DA	Ácido de dímero de óxido de hexafluoropropileno
HSP	Heat Shock Protein (proteína de choque térmico)
HSP10	Heat Shock Protein 10
HSP27	Heat Shock Protein 27
HSP60	Heat Shock Protein 60
HSP70	Heat Shock Protein 70
HSP90	Heat Shock Protein 90
IA	Inteligencia artificial
JH	Hormona juvenil
JHAMT	Juvenile Hormone Acid Methyltransferase
LC50	Concentración letal media
Met	Methoprene-tolerant
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MRP1	Multidrug Resistance-associated Protein 1
mRNA / ARNm	ARN mensajero
NLK	Nemo-like kinase
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFAS	Sustancias perfluoroalquiladas y polifluoroalquiladas

Abreviatura	Significado
PFECAs	Ácidos perfluoroalquil éter carboxílicos
PFOS	Perfluorooctanosulfonato
PFOA	Ácido perfluorooctanoico
qPCR	PCR cuantitativa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpL11	Proteína ribosomal L11
rpL13	Proteína ribosomal L13
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real con retrotranscripción
SSB	Rotura de cadena simple
TRIzol	Reactivo para extracción de ARN
UNED	Universidad Nacional de Educación a Distancia
USEPA	United States Environmental Protection Agency
USP	Ultraspiracle protein
Vg	Vitelogenina
Xrcc1	X-ray repair cross-complementing protein 1

Nombre del gen	Símbolo del gen	Función	Eficiencia	Secuencia	Referencia
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Producción de energía	94,1%	F: GGTATTTTCATTGAATGATCACTTTG R: TAATCCTTGGATTGCATGTACTT	57
Ribosomal protein L13	rpL13	Subunidad ribosomal	97,3%	F: ACCAGCTAGAAAGCACCGTC R: ATGGGCATCTGACGATTGGG	58
Ribosomal protein L11	rpL11	Subunidad ribosomal	106,8%	F: TGGCGAAAGCTACCGTCGTA R: TCACCAGATTCTCGACGCA	59
Heat shock protein	HSP90	Respuesta al estrés	108,1%	F: AGGCTGAAGCTGACAAGAATG R: TCATGCGATAAATGCGAGCAG	60
Heat shock protein	HSP70	Respuesta al estrés	102,8%	F: ACTTGAACCAGTTGAGCGT R: TTGCCACAGAAGAAATCTTG	61
Heat shock protein	HSP27	Respuesta al estrés	94,4%	F: TCAACACACAGGACCG R: ATCCTTTATTGGTGATTAATTATG	31
Heat shock protein	HSP60	Respuesta al estrés	105%	F: TGCTGTCCTTAAAGTCGGTGG R: TCCACCACCAGCAACGATTC	62
Heat shock protein	HSP10	Respuesta al estrés	102,6%	F: CGTCCAAAGAGCTGAGGCAT R: CTCCTGGACCGCAAGCAATA	63
X-ray repair cross complementing 1	Xrcc1	Reparación del ADN. SSB/DSB	109,7%	F: GACGATTTGCATTGGATAGT R: ATCAACATATCGCCATCAG	64
NEMO-like kinase	NLK	Reparación del ADN. SSB	98,3%	F: CATCTCACCAGATCGTCTCT R: GAATTTATTTGATTATGCGGC	64
Death executioner caspase related to Apopain/Yama	DECAY	Reparación del ADN. Apoptosis	97,9%	F: AAAGTGTTCCGATTATGGC R: TTCACACCAGTTAAATCCAC	64
FK506-binding protein of 39 kDa	FKBP39	Estrés oxidativo	100,2%	F: AGGCTGGGATATCGGACTCAT R: GTAAGCAAATGCAGGCGGG	60

Death regulator Nedd2-like caspase	DRONC	Sistema endocrino (20- E)	99,3%	F: GAAATGTCACAGATTTTCAGTGCC R: GTGAATATCGTAAGCATGTTCTG	65
Juvenile- O- metthyltransferase	JHAMT	Sistema endocrino (JH)	95,5%	F: AGAAAATGCTACGGGAAAGTG R: CAGGCATTAGCTTCAAGCAAGG	66
<i>Chironomus riparius</i> ecdysone receptor	EcR	Sistema endocrino (20- E)	102,9%	F: TCTTCTCACGGCCATCGTCA R: GCTGCATCTTGTTTCGCCAC	59
Methoprene-tolerant	Met	Sistema endocrino (JH)	97,3%	F: GAGTTCAGTACTTAAGCGCACTC R: GTGGAGGCTGTTGTGGCACTC	59
Ecdysteroid-regulated gene E74	E74	Sistema endocrino (20- E)	93,5%	F: TCTTACTGAACTTCTTCAAGATCG R: GCTTTGAGACAGCTTTGGAATCG	61
Ecdysone-induced protein 93F	E93	Sistema endocrino (20- E)	107,1%	F: CGAGAACCGAAACCACAGCC R: GCGCTGCCATTGATGGATGATC	67
Cytochrome P450 9f2	Cyp9f2	Detoxificación/ Respuesta antioxidante	99%	F: GTTCTCTACGCTCCATTCGGT R: GGTTGCCTCGAAGCTGAAGT	58
Glutathione S transferase omega 1	GSTo1	Detoxificación	96,8%	F : TGAGCTTGATAAGGTGCGCT R : TAATCAGGTGTGCCTGCGAG	58
Multidrug resistance- associated protein 1	MRP1	Detoxificación / Respuesta antioxidante	102,2%	F: TGGCCACAAAGTGGAATTGT R: CTTTCCAGCTCTGTTCGTC	59
Vitelogenina	Vtg1	Sistema endocrino (20- E)	112,3	F: GATTGTTCCATGTGCAG R: TTTGAGTATGGTGGAGAATC	68

Tabla A1. Genes analizados, secuencias de oligonucleótidos y eficiencia de amplificación utilizados en RT-qPCR.