Universitat de les Illes Balears

Facultat de ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Efectes de l'exposició a crema solar sobre l'expressió de gens a l'hepatopàncrees de musclos

Fernando Jiménez Romero

Grau de bioquímica

Any acadèmic 2015-16

DNI de l'alumne: 43216375L

Treball tutelat per Silvia Tejada Gavela
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
		X		X

Paraules clau del treball:
Mytilus galloprovincialis, sunscreen, oxidative stress, nanoparticles, titanium dioxide.
Protector solar, nanopartículas, dióxido de titanio, estrés oxidativo.

Contenido

1 Resumen 1
2 Introducción 2
3 Hipótesis 6
4 Objetivos 7
5 Método y técnicas 8
5.1 Diseño experimental 8
5.2 Aislamiento y purificación del ARN 9
5.3 Retrotranscripción 10
5.4 Cuantificación de la expresión génica mediante RT-PCR 10
5.5 Determinación de proteínas 11
5.6 Determinación de los niveles de carbonilación en proteínas 11
5.7 Determinación de los niveles de malondialdehído 13
5.8 Determinación de los niveles de dióxido de titanio 13
5.9 Análisis estadístico 14
6 Resultados 14
6.1 Metalotioneínas 14
6.2 Catalasa 15
6.3 Citocromo P450 3A1 16
6.4 GST 17
6.5 Carbonilos 18
6.6 Malondialdehído 20
6.6 Dióxido de titanio 21
7 Discusión 22
8 Bibliografía 26

1 Resumen

[esp] El impacto de los protectores solares en el ecosistema marino actualmente es un tema en auge. Algunos de los componentes presentes en estas formulaciones, como el dióxido de titanio (TiO_2), pueden suponer una fuente de estrés oxidativo para los organismos acuáticos. En el presente trabajo se evalúa la respuesta antioxidante y el daño oxidativo causado por diferentes concentraciones de protector solar comercial en *Mytilus galloprovincialis*, organismo ampliamente usado en la biomonitorización del medio marino. Para este fin, los bivalvos fueron separados en cuatro grupos experimentales y expuestos durante 24 horas a diferentes concentraciones de protector solar con un 1,4% de TiO_2: 0, 20, 200 y 2000 mg de crema solar por litro. Se determinó en hepatopáncreas la expresión génica de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), glutatión S-transferasa (GST) y citocromo P450 3A1 (CYP3A1) y las metalotioneínas MT1 y MT2. Adicionalmente se midieron los niveles de carbonilación proteica y de malondialdehído (MDA) en hepatopáncreas, ambos indicadores de daño oxidativo.

Se observó una respuesta adaptativa caracterizada por un incremento de la expresión génica de GST en los grupos expuestos a 20 y 200 mg de protector solar por litro, así como un incremento de la expresión de CYP3A1 en el grupo sometido a 200 mg de protector solar. Sin embargo, la expresión de la enzima catalasa permaneció constante en los cuatro grupos experimentales. Se observó un incremento significativo de las metalotioneínas en los grupos sometidos a 200 y 2000 mg de crema solar por litro, lo que supone una respuesta a la toxicidad frente a metales pesados. Finalmente, los sujetos expuestos a altos niveles de crema solar no pudieron hacer frente al estrés oxidativo, lo que indujo un incremento significativo de las concentraciones de malondialdehído (MDA) y de carbonilación proteica, marcadores de daño oxidativo lipídico y proteico, respectivamente.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que las formulaciones comerciales con dióxido de titanio son capaces de inducir estrés oxidativo en organismos acuáticos y su liberación en las costas debería ser monitorizada para prevenir daños en el ecosistema marino.

[eng] The impact of sunscreens on the marine ecosystem is a booming topic nowadays. Some of the components present in these formulations, as titanium dioxide (TiO_2), can be a source of oxidative stress to aquatic organisms. In this work, it has been evaluated the antioxidant response and oxidative damage caused by different concentrations of commercial sunscreen in *Mytilus galloprovincialis*, an organism widely used to monitor the marine environment. The bivalves were separated into four experimental groups and exposed during 24 hours to different concentrations of sunscreen with a 1.4% TiO_2: 0, 20, 200 and 2000 mg of sunscreen per litre. Gene expression of the antioxidant enzymes catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and cytochrome P450 3A1 (CYP3A1) and metallothioneins MT1 and MT2 was determined in hepatopancreas. Additionally, protein carbonylation and MDA levels, both indicators of oxidative damage, were measured.

An adaptive response characterized by increased gene expression of GST in groups exposed to 20 and 200 mg of sunscreen per litre, and an increased expression of CYP3A1 in the group receiving 200 mg of sunscreen was observed. However, expression of the enzyme catalase remained constant in the four experimental groups. A significant increase of metallothioneins in the groups with 200 and 2000 mg of sunscreen per liter, representing a response to toxicity against heavy metals, was found. Finally, the individuals exposed to high levels of sunscreen could not cope with oxidative stress, which induced a significant increase in malondialdehyde (MDA) levels and in protein carbonylation, markers of lipid and protein oxidation, respectively.

The results obtained in this work show that commercial formulations with titanium dioxide are capable of inducing oxidative stress in aquatic organisms and their release on the coast should be monitored to prevent damage to the marine ecosystem.

2 Introducción

El uso de cremas solares se ha incrementado en las últimas décadas gracias a la conciencia sobre los riesgos asociados a la exposición a radiaciones UV (Gasparro 2000). Sin embargo, su uso supone la introducción de múltiples compuestos químicos en el ecosistema marino, cuyos efectos son desconocidos y tan solo se han comenzado a estudiar recientemente. En la actualidad existen múltiples compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, que son capaces de filtrar los rayos UV del sol. Entre los compuestos

inorgánicos nos encontramos el dióxido de titanio (TiO_2), aprobado en todo el mundo para uso cosmético, con capacidad para filtrar radiación tanto UVA como UVB, y que es objeto de estudio en el presente trabajo.

Este compuesto ha sido encontrado en concentraciones que van de 6,9–37,6 μg/l en playas de Mallorca frecuentadas por turistas, los que suponen una fuente de contaminación al usar cremas solares. Este compuesto en particular supone un potencial peligro para el ecosistema marino, ya que se ha demostrado que es capaz de catalizar la formación de peróxido de hidrógeno mediante la fotólisis del agua, lo que supone suficiente estrés oxidativo para afectar directamente el crecimiento del fitoplancton e interrumpir la cadena alimentaria (Sánchez-Quiles and Tovar-Sánchez 2014).

Para evaluar el impacto ecotoxicológico de las cremas solares con TiO_2 se propone el uso de *Mytilus galloprovincialis* (conocido coloquialmente como mejillón mediterráneo) como especie bioindicadora. Esta especie es comúnmente usada para monitorizar aguas costeras ya que presenta múltiples ventajas (De Donno et al. 2008): (1) son invertebrados inmóviles, lo que los hace ideales para estudios a nivel local; (2) presentan una gran capacidad de filtración, de 6 a 8 litros de agua cada hora; (3) retienen fitoplancton y partículas orgánicas con lo que actúan como bioacumuladores, permitiendo estimar el nivel de contaminación a largo plazo; (4) sobreviven en un rango amplio de temperatura y salinidad; (5) resisten la contaminación química y bacteriológica y (6) acumulan estos contaminantes de forma proporcional a la existente en el ambiente.

Gracias a estas ventajas, estos bivalvos han sido usados para controlar la calidad del agua de diversas zonas costeras como los golfos de Thermaikos y Strymonikos en el norte de Grecia (Koukouzika and Dimitriadis 2005), las costas del sur de Portugal (Bebianno et al. 2007), la península de Salento en Italia (De Donno et al. 2008), el mar Adriático (JOVIĆ et al. 2011), etc.

La polución puede ser de diversa naturaleza pero destacan microorganismos fecales, contaminantes orgánicos y metales pesados.

El estudio del impacto ecotoxicológico de las cremas solares es reciente y complejo, ya que en la formulación de estos productos se incluye numerosos compuestos orgánicos e inorgánicos. En las costas de Mallorca, Tovar-Sánchez et al. (2013) han hallado concentraciones variables de filtros UV orgánicos (benzofenona 3 (BZ-3) y 4-

metilbencilideno alcanfor (4-MBC)) e inorgánicos (zinc (Zn) y titanio (Ti)). Las consecuencias son relevantes ya que los protectores solares inhiben el crecimiento de la diatomea *Chaetoceros gracilis* y la gran cantidad de nutrientes inorgánicos que liberan (fósforo, nitrógeno y silicio) induce el crecimiento de algas, con lo que todo el ecosistema marino se ve afectado.

La toxicidad de algunos de estos componentes ha sido evaluada en organismos acuáticos, incluido *M. galloprovincialis*. Por ejemplo, los filtros UV orgánicos 4-MBC y EHMC (2-etil-hexil-4-trimetoxicinamato) son muy tóxicos para los invertebrados, presentando un EC_{50} (concentración efectiva media) de 587,17 µg/l y 3118,18 µg/l, respectivamente, en *M. galloprovicialis (Paredes et al. 2014).* La BZ-3 es tóxico para la microalga *Isochrysis galbana* en concentraciones muy bajas (del orden de ng/l). Se trata además de un problema a escala global, ya que muchos de estos compuestos han sido encontrados no solo en las costas de grandes ciudades como Hong Kong, Tokio, Bangkok, Nueva York o Los Ángeles, sino que han llegado incluso al mar Ártico (Tsui et al. 2014).

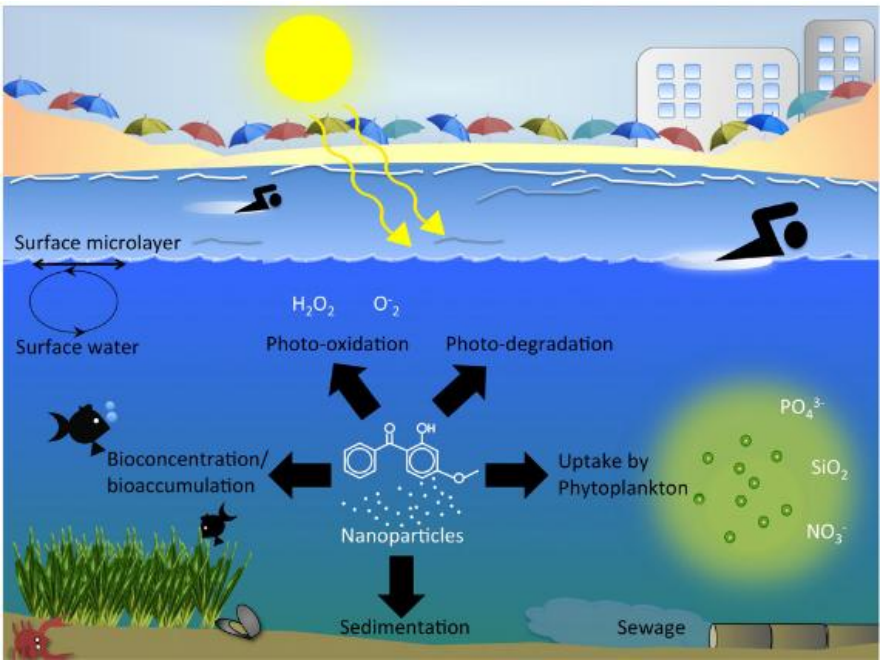


Ilustración 1: Diagrama conceptual sobre las rutas que siguen los productos derivados de las cremas solares. Extraído de Sánchez-Quiles and Tovar-Sánchez 2015.

Por otra parte, los filtros UV inorgánicos también son objeto de estudio. Los protectores solares son una fuente de dióxido de titanio (TiO_2) y óxido de zinc (ZnO) en forma de nanopartículas, clasificación que reciben todas aquellas partículas cuyo tamaño oscile

entre 1 y 100 nm (Masciangioli and Zhang 2003). El campo de los nanomateriales se encuentra en constate evolución y sus efectos biológicos aún no han sido dilucidados completamente. Las nanopartículas de TiO_2, SiO_2 y fullereno suspendidas en el medio acuático inducen una respuesta inmune e inflamatoria en *M. hemocytes* (Canesi et al. 2010) y en *M. galloprovincialis* inducen estrés oxidativo caracterizado por una elevación de la actividad catalasa y glutatión-S-transferasa tanto en la glándula digestiva como en branquias (L. Canesi et al. 2010). Además, las nanopartículas de TiO_2 en concentraciones similares a las halladas en ambientes acuáticos suponen, según algunos investigadores, una seria amenaza a la salud y viabilidad biológica de *M. galloprovincialis* por los notables cambios que induce en parámetros inmunológicos (Barmo et al. 2013). En comparación con las partículas de TiO_2 de mayor tamaño, estas nanopartículas alcanzan concentraciones 6 veces superiores en el hepatopáncreas, órgano dónde mayor bioacumulación se da (hasta 10 veces más en comparación con las branquias). Sin embargo, solo inducen la expresión de la metalotioneína MT10 en branquias, y el daño histopatológico observado en ambos tejidos parece ser mayor en los bivalvos tratados con TiO_2 estándar (D'Agata et al. 2014).

Esta observación entra en contradicción con la mayor toxicidad aguda que presentan las nanopartículas de TiO_2 en otros organismos acuáticos, como el pez cebra (*Danio rerio*) (Xiong et al. 2011), *Caenorhabditis elegans* y *Daphnia magna* (Zhu et al. 2008; Wang et al. 2009).

Además, cabe destacar que los efectos biológicos de los nanomateriales no solo dependen de su composición química: otros parámetros como el tamaño de la partícula, superficie activa o forma cristalina modulan la respuesta biológica (Menard, Drobne, y Jemec 2011). También hay que tener en cuenta la tendencia que ofrecen las nanopartículas en suspensión a agregarse, cambiando sus propiedades. Por tanto, es imprescindible caracterizar los nanomateriales a estudiar para evaluar correctamente sus efectos a nivel biológico.

El estrés oxidativo que causan estas nanopartículas involucra la formación de radicales hidroxilo en el citoplasma que da lugar a la formación de radicales carboxilo, el anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Dodd and Jha 2009), y ha sido evaluado por diferentes autores mediante el uso de biomarcadores. Entre ellos destacan la actividad y expresión génica de las enzimas catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST),

glutatión reductasa (GSR) y la glutatión peroxidasa (GPX) así como la concentración de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), siendo el malondialdehído (MDA) el representante mayoritario de esta categoría.

A pesar de que los bivalvos son un organismo interesante para el estudio de los efectos biológicos de los nanomateriales, aún no existen datos acerca de la interacción de las nanopartículas de TiO_2 y otros marcadores de estrés oxidativo ampliamente usados en la biomonitorización del medio marino, como la superóxido dismutasa (SOD), y se desconoce si estas nanopartículas provocan en todos los casos una respuesta similar a la exposición a metales pesados, caracterizada por una elevación de metalotioneínas (MT) y la enzima ácido δ-aminolevulínico dehidratasa (ALAD) (Serafim et al. 2011).

Tampoco hay estudios suficientes sobre el estrés oxidativo causado por cremas solares que contienen filtros UV tanto orgánicos como inorgánicos y que pueden actuar de forma sinérgica, aumentando el daño oxidativo causado a organismos acuático.

Hasta el momento, se ha descrito en branquias de *M. galloprovincialis* como una crema solar con un 1,4% de TiO_2 induce *in vivo* estrés oxidativo a bajas concentraciones (20 mg/l) y daño oxidativo a concentraciones mayores (200 y 2000 mg/l), reflejado en un incremento de malondialdehído y metalotioneínas junto con la inhibición de la actividad acetilcolinesterasa (AChE) (Busquets Cortés *et al.* 2016).

Con el fin de obtener más información acerca de los efectos biológicos de estas formulaciones, en el presente trabajo se evaluará la expresión de genes antioxidantes y detoxificantes así como la concentración de biomarcadores de daño oxidativo en hepatopáncreas usando diferentes concentraciones de esta misma crema solar.

3 Hipótesis

Ya se ha descrito previamente que la exposición a cantidades bajas de crema solar (20 mg/l) producen una respuesta antioxidante en forma de incremento de la actividad enzimática en branquias de las actividades superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y Glutatión-S-Transferasa (GST), indicativas de una situación de estrés oxidativo. Los grupos tratados con concentraciones de crema solar más alta (200 y 2000 mg/l) son incapaces de contrarrestar el estrés oxidativo y se produce daño oxidativo, demostrado por un aumento significativo de MDA y metalotioneínas (MTT) y una inhibición de la actividad acetilcolinesterasa.

La hipótesis del presente trabajo es que en la glándula digestiva del mejillón (hepatopáncreas), también se producirá un aumento de la actividad de enzimas antioxidantes, correspondida por un aumento de su expresión génica. Por tanto, en el presente trabajo esperamos encontrar un aumento de la expresión génica de las enzimas catalasa, glutatión-S-transferasa, citocromo P450 3A1 y las metalotioneínas MT10 y MT20 de forma dosis-dependiente y proporcional a los niveles de crema solar disuelta en el medio. También se espera hallar daño oxidativo considerable en el grupo expuesto a mayor cantidad de protector solar (2000 mg/l), reflejado en un aumento de la concentración de MDA y de carbonilación proteica.

4 Objetivos

El objetivo del presente trabajo es evaluar el potencial daño oxidativo capaz de ejercer una formulación comercial de protector solar con un 1,4% de dióxido de titanio en medio acuático usando *Mytilus galloprovincialis* como especie bioindicadora.

Para este fin, se ha analizado la expresión génica en hepatopáncreas de diversas proteínas usadas como biomarcadores en el campo de la ecotoxicología, como las enzimas catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST) y el citocromo P450 3A1, así como las metalotioneínas MT1 y MT2. Las tres primeras codifican para proteínas con importante actividad antioxidante con capacidad para paliar los daños ocasionados por el peróxido de hidrógeno y otros xenobióticos: la enzima CAT se encarga de la degradación del peróxido de hidrógeno, un intermediario en la formación de radicales libres de oxígeno (ROS), mientras que las enzimas GST y el citocromo P450 3A1 son enzimas que participan en la fase 1 y la fase 2 de detoxificación de xenobióticos, respectivamente. Por otra parte, las metalotioneínas MT1 y MT2 se expresan en presencia de metales pesados y gracias a su efecto quelante pueden evitar la toxicidad provocada por estos metales.

Adicionalmente, hemos medido los niveles tisulares de carbonilación proteica y de malondialdehído, que son productos de la oxidación de proteínas y lípidos, respectivamente. Su formación indica que los sistemas de detoxificación celulares, como las enzimas comentadas previamente, no han podido hacer frente al estrés celular provocado por, en nuestro caso, los componentes del protector solar disueltos en el agua.

5 Método y técnicas

5.1 Diseño experimental

El diseño experimental fue propuesto y llevado a cabo por Busquets Cortés *et al.* 2016 (Ilustración 1). Se usaron mejillones *Mytilus galloprovincialis* adquiridos en un supermercado local, los cuales se aclimataron en agua de mar 24 horas antes de realizar el experimento. Se escogieron 40 mejillones con tamaños similares y se distribuyeron en 4 peceras equitativamente (n=10/grupo), una por cada grupo experimental. Durante 24 horas se sometió a cada grupo experimental a las siguientes concentraciones de crema solar:

- Grupo control: sin exposición a crema solar
- Tratamiento 20: 20 mg crema solar/l
- Tratamiento 200: 200 mg crema solar/l
- Tratamiento 2000: 2000 mg crema solar/l

La crema solar usada se trata de un producto comercial con factor de protección 60 y 1,4% TiO_2. En su composición también se encuentran dos filtros UV orgánicos, uno hidrosoluble activo frente a los rayos UVA y otro liposoluble anti-UVA/UVB.

De esta manera, los grupos tratamiento 20 y tratamiento 200 están expuestos a una concentración de TiO_2 de 2,8 µg/L y 28 µg/L, respectivamente, emulando las concentraciones encontradas en varias playas de Mallorca (Tovar-Sánchez et al. 2013). El grupo tratamiento control, sometido a una dosis de 280 µg TiO_2/L pretende simular los efectos de la exposición prolongada de la crema solar al mejillón.

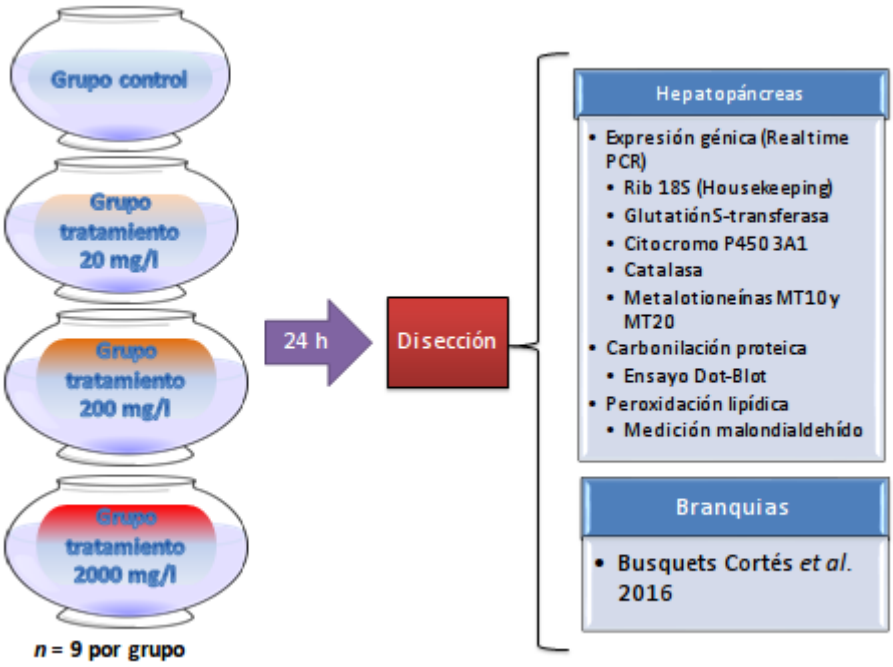


Ilustración 2: esquema del diseño experimental

Finalizado el tiempo de exposición, de procedió a la disección de los mejillones, obteniéndose las branquias y el hepatopáncreas de cada sujeto (n=9 por cada grupo experimental). El hepatopáncreas, almacenado a -75 ºC, es el objeto de estudio del presente trabajo.

5.2 Aislamiento y purificación del ARN

La obtención de ARN a partir del tejido hepatopancreático (n=9 por grupo experimental, n_{total}=36 muestras) se realizó mediante Tripure comercial (Roche Diagnostics GmbH, Cat. No. 11 667 157 001), homogenando el tejido con ayuda de un Polytron y siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial.

Una vez obtenido los *pellets* de ARN libres de impurezas, totas las muestras se resuspendieron en 200 µl de agua libre de RNAsas y se procedió a la cuantificación espectrofotométrica del ARN en un *Biotek Powerwave XS* (software Gen5 versión 1.10.8) mediante la obtención de los ratios A260/A280 de cada muestra.

5.3 Retrotranscripción

Se realizó la retrotranscripción del ARN de todas las muestras (n=36 más blanco) en un sistema GeneAmp PCR System 9700. Con los datos obtenidos tras cuantificar el ARN, se calculó el volumen de solución requerido para disponer de 1μg de ARN y se desnaturalizó previamente a 100 ºC, entonces se añadió 5 μl/muestra de *RT mix* comercial (Tetro cDNA Synthesis Kit; Cat. No. BIO-65043) previamente preparada, se sometió a cada muestra a un ciclo de retrotranscripción de 1 hora a 42 ºC y finalmente 5 minutos a 95 ºC. El uso de hexámeros aleatorios como *primers* permitió amplificar todo el ARN presente en las muestras. El cDNA así obtenido se diluyó en 90 μl de agua libre de RNAasas y se conservó a -20 ºC para la posterior cuantificación de la expresión génica de los genes de interés en este estudio.

5.4 Cuantificación de la expresión génica mediante RT-PCR

Mediante *real time PCR* (RT-PCR) se cuantificó la expresión de los genes ribosómico 18S (*housekeeping*), metalotioneínas MT10 y MT-20, catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa GST y citrocromo P450 3A1 (CYP3A1). Para cada gen se preparó una mix compuesta de 200 μl de mix comercial Takara Bio SYBR Green Master Mix, 8 μl de cada primer correspondiente y 84 μl de agua.

Se pipeteó 7 μl de mix por pocillo en una placa de 96 pocillos y 3 μl de muestra (V_{total}=10 μl por pocillo). En cada ensayo se añadieron dos blancos. Una vez preparada la placa, se procedió a realizar la RT-PCR en un termociclador Roche LightCycler® 480 II, dónde se cuantificó la emisión del complejo fluorescente cDNA-SYBR Green (pico de absorción en λ = 498 nm; pico de emisión en λ = 522 nm) de todas las muestras en cada ciclo.

Gen	Primer	Nº ciclos	Tª (ºC)	Tiempo (s)	Secuencia del primer
18S rRNA (control interno)	MYT-18S-Fw MYT-18S-Rv	40	95/59/72	15/30/20	5'-TCgATggTACgTgATAgCC 5'-CgTTTCTCATgCTCCCTCTC
mt-10	MYT-MT10-F MYT-MT10-R	40	95/59/72	15/30/20	5'-gggCgCCgACTgTAAATgTTC 5'-CACgTTgAAggCCTgTACACC
mt-20	MYT-MT20-F MYT-MT20-R	50	95/60/72	10/10/15	5'-TgTgAAAgTggCTgCggA 5'-gTACAgCCACATCCACACgC
cat	CAT-Myt Fw CAT-Myt Rv	40	95/55/72	15/30/20	5'-CgACCAgAgACAACCCACC 5'-gCAgTAgTATgCCTgTCCATCC
gst	GST Fw GST Rv	40	95/55/72	15/30/20	5'-TCCAgTTAgAggCCgAgCTgA 5'-CTgCACCAgTTggAAACCgTC
cyp3a1	CYP3A1 Fw CYP3A1 Rv	40	95/55/72	15/30/20	5'-TgAACTCgCAAAAAgAACCA 5'-ggAACACTggAgCCTTgAAC

Tabla 1: primers y condiciones usadas para cada ensayo RT-PCR. Todos los primers provienen de la casa comercial TIB MOLBIOL.

5.5 Determinación de proteínas

El tejido hepatopancreático (200 mg) se homogeneizó en tampón tris-HCl a pH 7,5. Tras eliminar el precipitado por centrifugación a 9000 G durante 15 minutos a 4 ºC, se determinó la concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford modificada (Bradford 1976). Las muestras, previa dilución 1/3, y el patrón de BSA por duplicado (Albúmina Sérica Bovina) se depositaron en una microplaca de 96 pocillos y se leyeron en un espectrofotómetro BIO-TEK PowerWave XS. El sobrenadante resultante se conservó a -20 ºC para posteriores determinaciones.

5.6 Determinación de los niveles de carbonilación en proteínas

Los niveles de carbonilación en proteínas fueron determinados mediante la técnica Dot Blot. Se depositó en cada pocillo de forma aleatorizada el equivalente a 10 µg de proteínas de cada muestra más un duplicado por grupo (n_{total}=32; 8 muestras por grupo experimental), determinadas anteriormente por el método de Bradford modificado descrito en el apartado *5.5 Determinación de proteínas*. Se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD® Trans-Blot Transfer Medium; tamaño de poro: 0,45 µm; Cat. No. 162-0115) mediante succión por vacío y se lavó con agua.

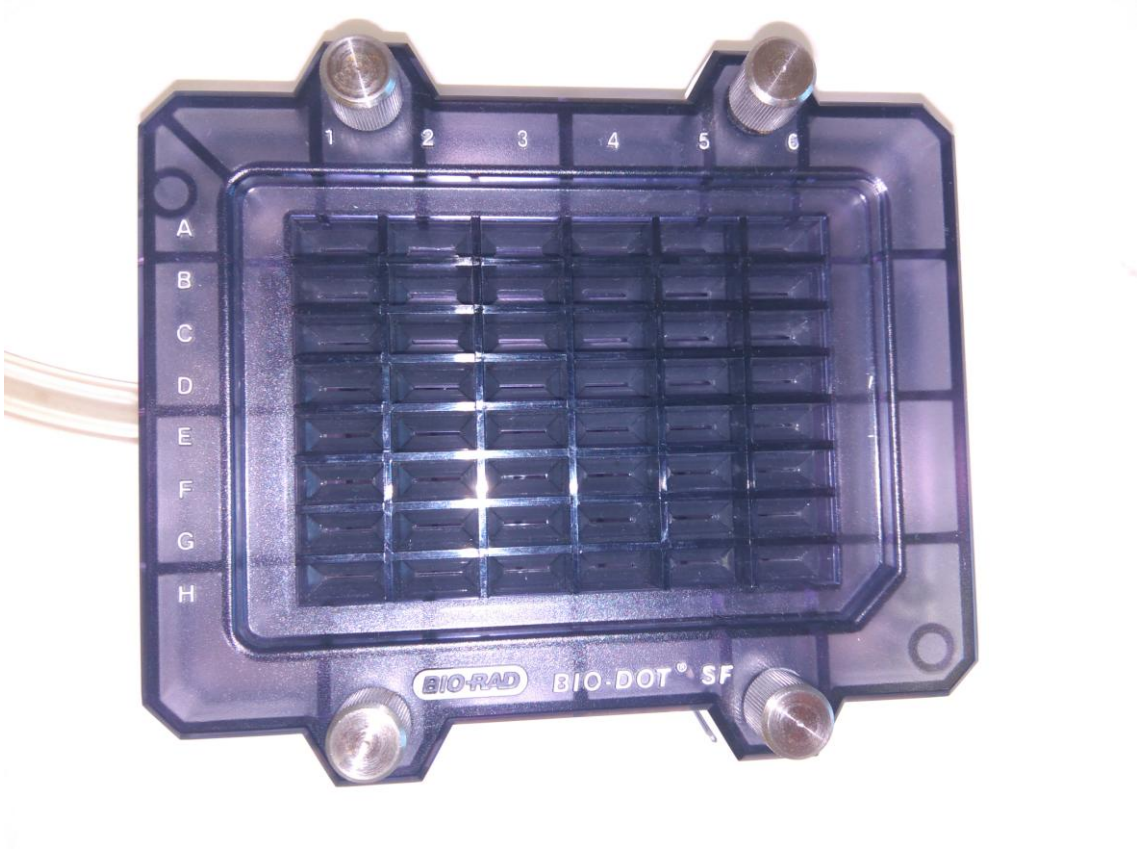


Ilustración 3: unidad de microfiltración BIO-RAD BIO-DOT SF con la que se realizó el ensayo Dot Blot descrito en este apartado. La succión de las muestras se logra mediante la conexión a una bomba de vacío.

Posteriormente la membrana de derivatizó con 2,4-dinitrofenilhidrazina (de la casa comercial ALDRICH®; Cat.: D19.930-3; Lote S06838-071) en medio ácido (20 mg dinitrofenilhidrazina en HCl 2N). Esta reacción está descrita en la *Ilustración 3*.

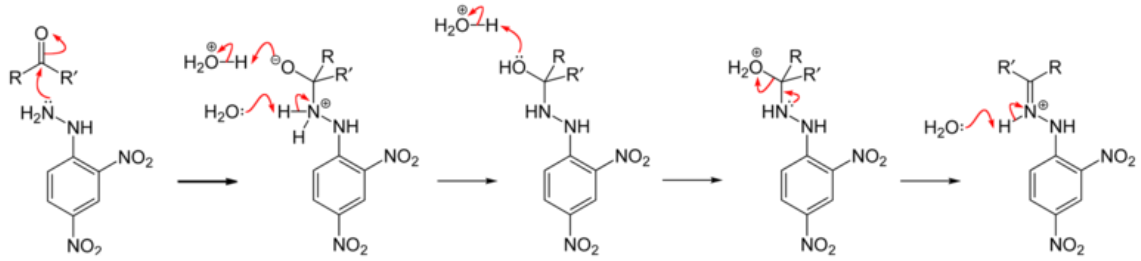


Ilustración 4: mecanismo de la reacción de Brady. La 2,4-dinitrofenilhidrazina actúa como nucleófilo durante la derivatización y ataca el carbono de los grupos carbonilos (cetonas y aldehídos) dando como producto la correspondiente hidrazona (Brady and Elsmie 1926).

Una vez lavada para eliminar los restos de dinitrofenilhidrazina (DNPH) no unidos covalentemente a las proteínas presentes en la membrana, se procedió al bloqueo con leche en polvo en solución (1 hora) y posterior incubación *overnight* del anticuerpo primario (anticuerpo Anti-DNP no conjugado producido en conejo de la casa SIGMA-ALDRICH®, Cat.: D9656-2ML). Pasado ese tiempo, se lavó la membrana y se incubó con el anticuerpo secundario (SIGMA® ANTI-RABIT IgG conjugado con peroxidasa, Cat.: A-0545, Lote 053K4853).

Finalmente y tras el correspondiente lavado, se reveló la membrana con el kit BIO-RAD® Immune-Star WesternC (Cat.: #170-5070) y se obtuvo la imagen en una cámara BIO-RAD® Universal Hood II. Se cuantificó la intensidad de las bandas obtenidas y se realizaron los correspondientes cálculos.

5.7 Determinación de los niveles de malondialdehído

Como marcador de peroxidación lipídica se determinaron los niveles de malondialdehído (MDA) en el homogenado de hepatopáncreas descrito en el apartado *5.5 Determinación de proteínas* mediante el reactivo 1-Metil-2-fenilindol, que forma un complejo coloreado en presencia de MDA, cuyo pico de absorbancia está en 586 nm (Gérard-Monnier et al. 1998). Las muestras y el patrón, realizado por duplicado, se pipetearon en una placa de 96 pocillos y tras la lectura se realizaron los cálculos requeridos para la cuantificación y posterior estadística.

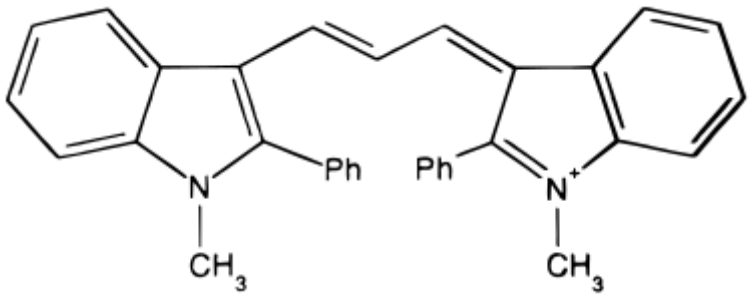


Ilustración 5: estructura del cromóforo obtenido a partir de la reacción de MDA con 1-Metil-2-fenilindol. Extraído de Gérard-Monnier et al. 1998

5.8 Determinación de los niveles de dióxido de titanio

Los niveles de titanio fueron medidos mediante Espectrometría de Emisión con fuente de Ionización, llevada a cabo por el Dr. Antonio Sureda (UIB). Se evaluaron 3 sujetos enteros por grupo experimental y los datos se expresan como µg Ti/g tejido seco.

5.9 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresan como media ± error estándar (SEM) y se representan en diagramas de barras mediante Microsoft Excel 2010. Las correspondientes barras de error representan los errores estándar de la media.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software IBM SPSS Versión 23.

Tras verificar la homogeneidad de las varianzas entre los distintos grupos control mediante el estadístico de Levene, se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido de test *post-hoc* DMS para identificar diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

En los casos en que el estadístico de Levene arrojó varianzas dispares entre grupos (GST, concentración de titanio y carbonilos), se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para muestras independientes.

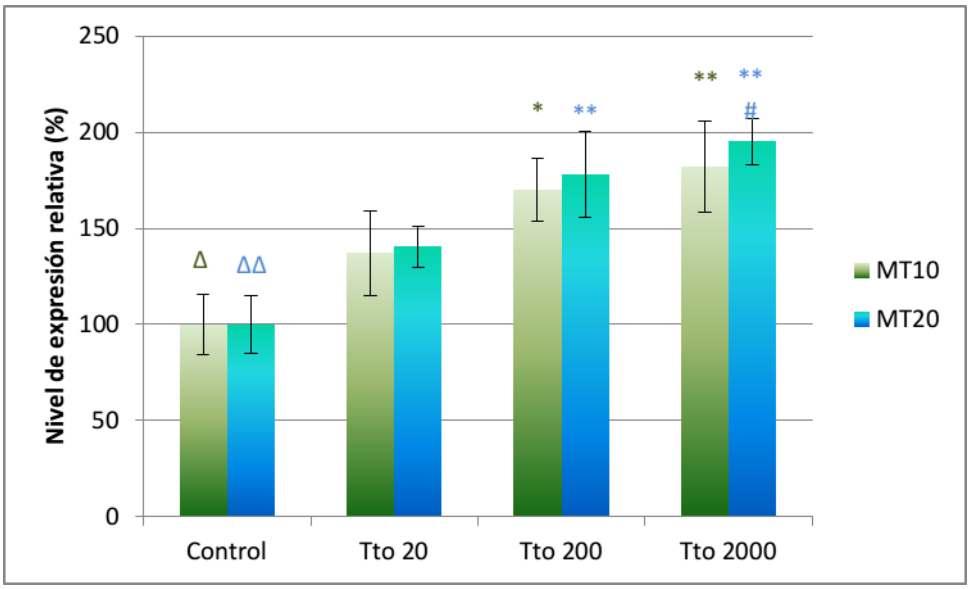
6 Resultados

6.1 Metalotioneínas

La expresión génica de las dos isoformas de metalotioneínas analizadas, MT10 y MT20, se vieron incrementadas de forma similar tras la exposición a las diferentes concentraciones de crema solar (Gráfica 1).

Respecto al grupo control, los mejillones expuestos a 20 mg/l (Tto 20) de protector solar sufren un cierto incremento de la expresión génica de MT10 y MT20 de un 37% (137,0±22,25%; $p = 0,194$) y un 40% (140,4±10,91%; $p = 0,078$), respectivamente, aunque sin ser estadísticamente significativos.

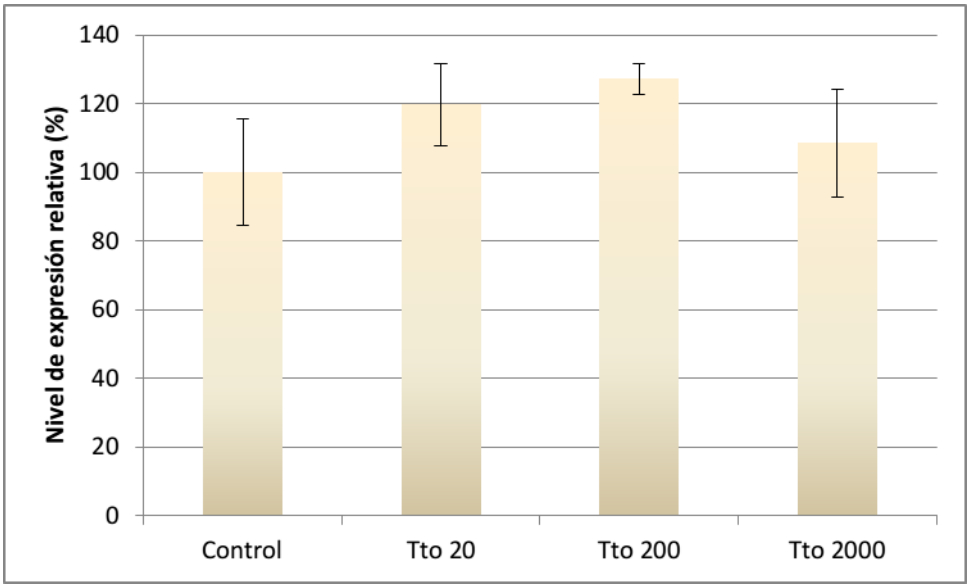
La expresión génica se incrementa, ya de forma estadísticamente significativa, en los grupos experimentales expuestos a mayores concentraciones de protector solar. Los mejillones expuestos a 200 mg/l (Tto 200) de protector solar ven aumentada la expresión génica de MT10 en un 70% (169,9±16,42%; $p < 0.05$) y de MT20 en un 78% (178,3±22,36%; $p < 0,01$). En el grupo experimental expuesto a 2000 mg/l (Tto 2000) de protector el incremento es aún mayor, siendo respecto al grupo control de un 82% (182,1±23,54%; $p < 0,01$) para MT10 y un 95% (195,1±11,96%; $p < 0,01$) para MT20.



Gráfica 1: expresión génica de las isoformas MT10 y MT20 en hepatopáncreas de mejillón en los cuatro grupos de estudio (media±SEM; n=9). Se observa para ambas isoformas el mismo patrón, con tendencia a incrementar la expresión génica a medida que aumenta la concentración de crema solar a la que han sido expuestos. ** $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs grupo Control; # $p < 0,05$ vs Tto 20 (*20 mg/l*); Δ $p < 0,05$ y ΔΔ $p < 0,01$ vs Tto 200 (*200 mg/l*).

6.2 Catalasa

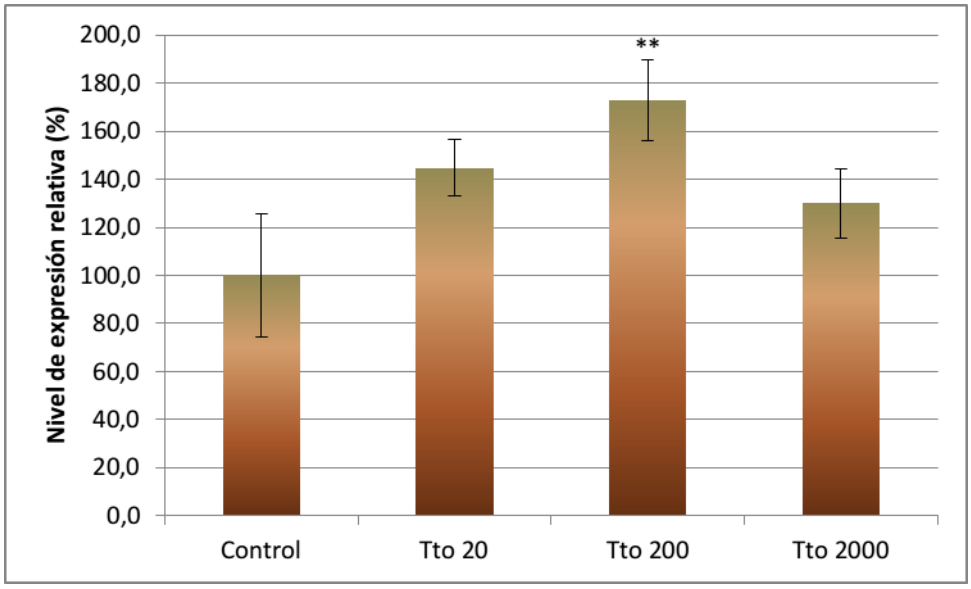
No se han identificado diferencias significativas en la expresión del gen catalasa (CAT) entre ninguno de los grupos experimentales (Gráfica 2). Si bien la expresión media en los grupos tratados con protector solar es ligeramente superior respecto al grupo control (119,7±11,93% para 20 mg/l (Tto 20); 127,2±4,43% para 200 mg/l (Tto 200) y 108,5±15,63% para 2000 mg/l (Tto 2000)), el test ANOVA no arroja diferencias en comparación con el grupo control ni entre los grupos con tratamiento.



Gráfica 2: expresión génica de cat, gen codificante para la enzima catalasa, en hepatopáncreas de mejillón en los cuatro grupos de estudio (media±SEM; n=9). Sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ningún grupo.Control: 0mg/l. Tto 20: 20 mg/l. Tto 200: 200 mg/l. Tto 2000: 2000 mg/l.

6.3 Citocromo P450 3A1

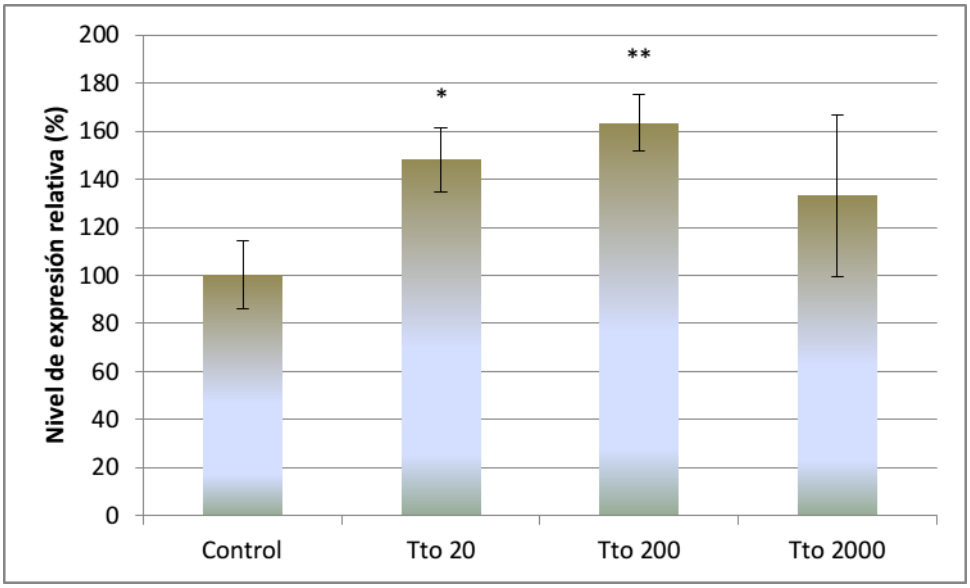
Los niveles de expresión del citocromo P450 3A1 (CYP3A1) hepatopancreático presentan tendencia a elevarse en el grupo Tto 20 (20 mg/l) vs Control (144,7±11,88%; $p = 0,086$) y se elevan muy notablemente en el grupo Tto 200 (200 mg/l) vs Control (172,9±16,82%; $p < 0,01$). Sin embargo, esta tendencia al alza no se da en el grupo Tto 2000 (2000 mg/l), el cual presenta niveles de expresión similares a los del grupo control (129,9±14,18%; $p = 0,246$). Este último grupo experimental presenta una tendencia a ser menor respecto al grupo Tto 200, si bien no llega a ser estadísticamente significativa ($p = 0,098$).



Gráfica 3: niveles de expresión génica del citocromo P450 3A1 en hepatopáncreas de mejillón en los cuatro grupos de estudio (Media±SEM; n = 9). Se observa una tendencia al alza a medida que aumenta la dosis de protector solar, que vuelve a valores basales en el grupo sometido a mayor concentración de crema (2000 mg/l (Tto 2000)). *** p < 0,01 vs grupo Control.*

6.4 GST

La concentración de mRNA codificante para el enzima glutatión-S-transferasa (GST) en hepatopáncreas en los diferentes grupos experimentales sigue una tendencia muy similar a la observada para la expresión del gen Cyp3A1. Se da un incremento estadísticamente significativo en el grupo Tto 20 (20 mg/l) (148,1±13,53%; $p < 0,05$) y muy notablemente en el grupo Tto 200 (200 mg/l) (163,4±11,85%; $p < 0,01$) respecto al grupo Control. Sin embargo, en el grupo Tto 2000 (200 mg/l) los niveles de expresión génica de GST no difieren considerablemente en comparación con el grupo Control (133,1±33,82%; $p = 0,965$).



Gráfica 4: niveles de expresión génica del enzima glutatión-S-transferasa (GST) en hepatopáncreas de mejillón en los cuatro grupos de estudio (Media±SEM; n = 9). Se observa un incremento considerable en los grupos Tto 20 (20 mg/l) y Tto 200 (200 mg/l), pero en el grupo Tto 2000 (2000 mg/l) se vuelve a niveles basales. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ *vs grupo Control.*

6.5 Carbonilos

La carbonilación proteica es muy similar en los dos grupos experimentales expuestos a menor cantidad de protector solar en comparación con el grupo control.

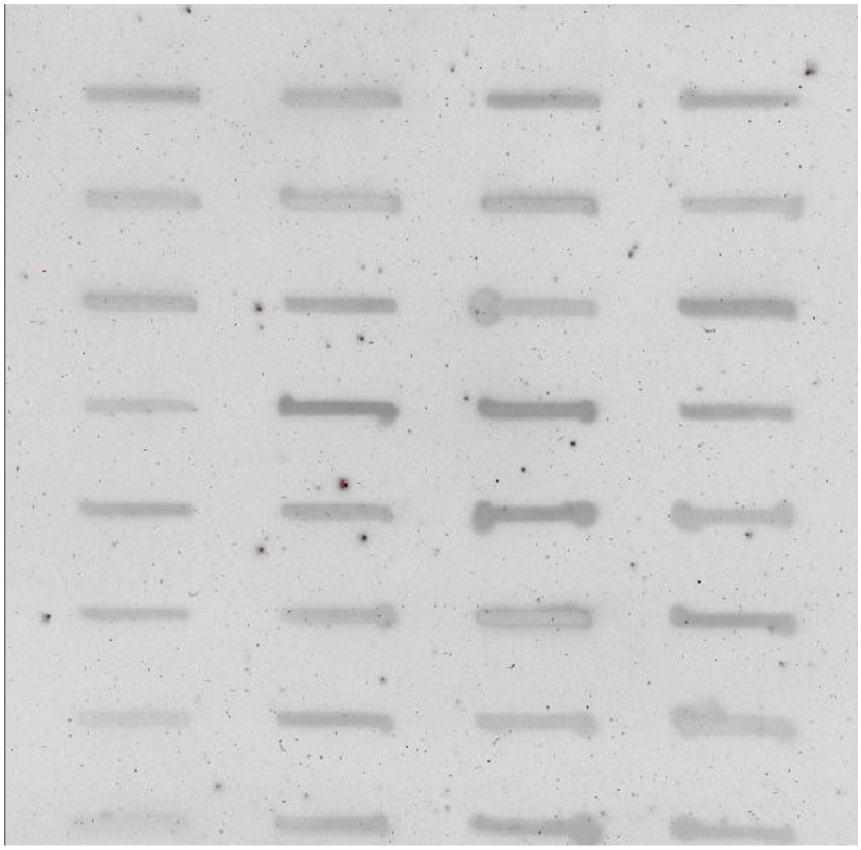
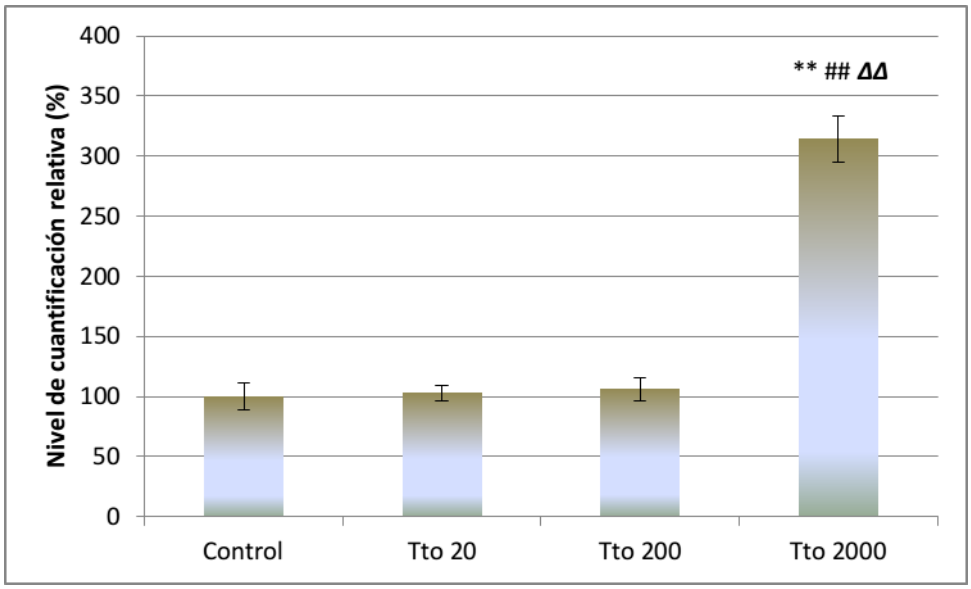


Ilustración 6: Ensayo Dot Blot para la detección de grupos carbonilo en muestras de hepatopáncreas de *Mytilus galloprovincialis sometidos a diferentes concentraciones de protector solar.* El orden de las muestras sobre la membrana es aleatorio.

En el grupo Tto 20 (20 mg/l) el índice de carbonilación es de un 103,1±6,51% vs Control ($p = 1,00$), y en el grupo Tto 200 (200 mg/l) es de 106,4±9,58% vs Control ($p = 0,753$). Sin embargo la carbonilación proteica se dispara en el grupo Tto 2000 (2000 mg/l), siendo la diferencia notablemente significativa respecto a los otros tres grupos experimentales: se alcanza un 314,4±19,23% vs Control ($p < 0,01$).

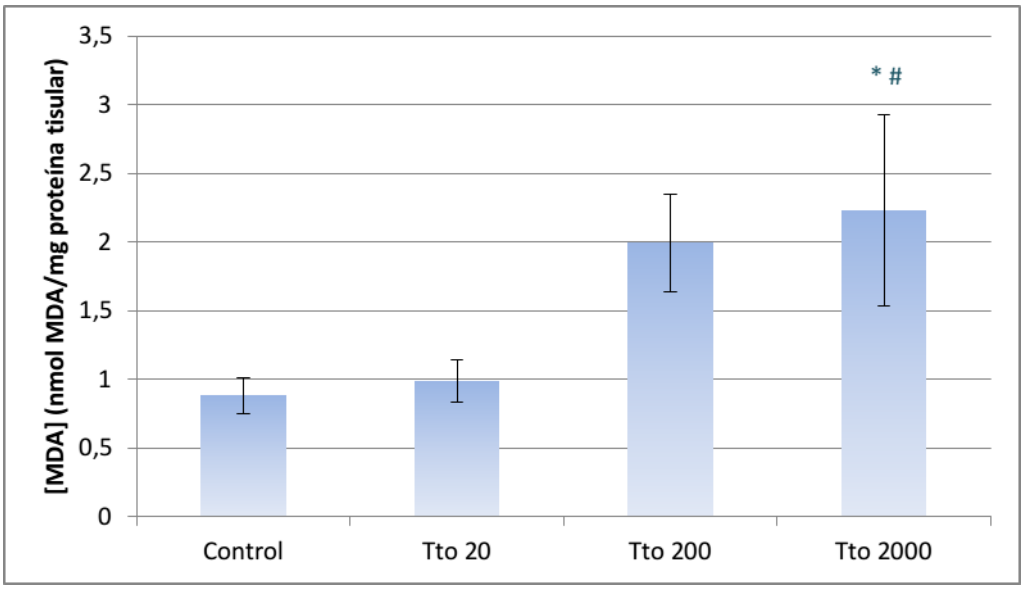


Gráfica 5: carbonilación proteíca en hepatopáncreas de mejillón en los cuatro grupos experimentales (Media±SEM; n = 8). El grupo Tto 2000 (2000 mg/l) es el único que difiere a nivel estadístico respecto al resto, de forma muy notable. *** *p < 0,01 vs grupo Control; ## p < 0,01 vs Tto 20 (20 mg/l);* ΔΔ *p < 0,01 vs Tto 200 (200 mg/l).*

6.6 Malondialdehído

Se han hallado niveles de malondialdehído (MDA) notablemente altos en los bivalvos expuestos a la mayor concentración de crema solar (2000 mg/l) en hepatopáncreas. En el grupo control hay una concentración de MDA de 0,882±0,132 nmol MDA/mg proteína tisular. Similares niveles se dan en el grupo Tto 20 (20 mg/l), con 0,986±0,155 nmol MDA/m. En el grupo Tto 200 (200 mg/l) hay una tendencia al alza en hepatopáncreas (1,99±0,355 nmol MDA/mg; p = 0,061).

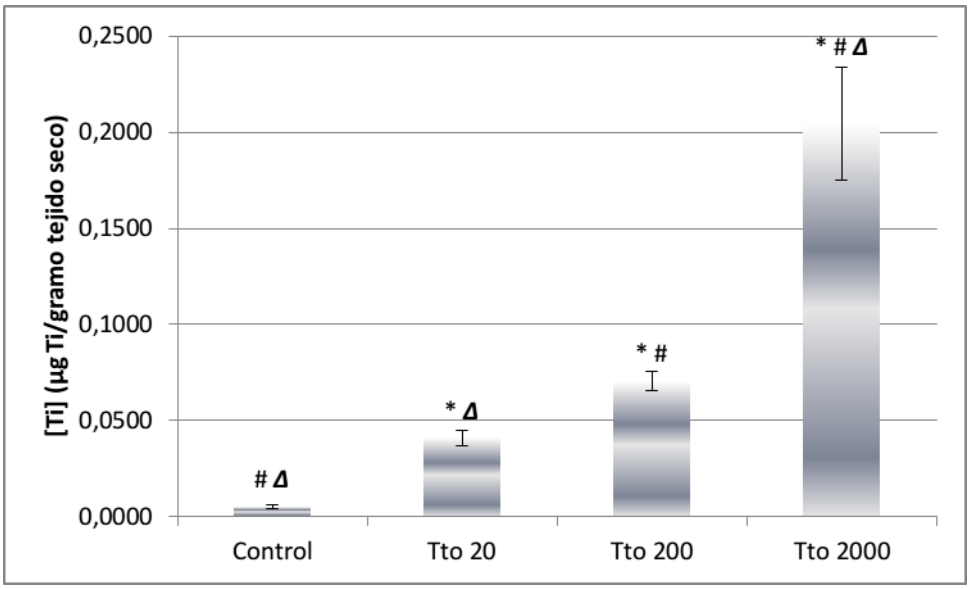
Las diferencias significativas las hallamos en el grupo Tto 2000 (2000 mg/l): los niveles medidos han sido de 2,23±0,695 nmol MDA/mg proteína tisular, estadísticamente diferente respecto al grupo Control y Tto 20 (p < 0,05).



Gráfica 6: concentración tisular de MDA en hepatopáncreas en los cuatro grupos experimentales (media±SEM; n=8). Los valores han sido estandarizados por masa proteica se expresan en nmol MDA/mg proteína tisular. Se observa en ambos tejidos un gran incremento de este indicador de la peroxidación lipídica en el grupo Tto 2000. ** $p < 0,05$ vs grupo Control; # $p < 0,05$ vs Tto 20.*

6.6 Dióxido de titanio

Los niveles de titanio totales aumentan a medida que lo hace la concentración de protector solar disuelto en el medio. Los niveles basales de titanio (grupo Control) son de 0,0052±0,00076 µg Ti/gramo tejido seco. En el grupo Tto 20 (20 mg/l) asciende a 0,0409±0,00376 µg Ti/gramo tejido seco, lo que supone casi 8 veces más respecto al grupo control. En el grupo Tto 200 (200 mg/l) se incrementa hasta llegar a 0,0706±0,00468 µg Ti/gramo tejido seco (~13 veces más que el grupo control). El valor más alto lo alcanzamos en el grupo Tto 2000 (2000 mg/l) donde las concentraciones llegan a 0,204±0,0292 µg Ti/gramo tejido seco, esto supone 39 veces más titanio tisular que el grupo Control.



Gráfica 7: concentración tisular total de titanio en *Mytilus galloprovincialis* en los cuatro grupos experimentales (media±SEM; n=3). Los valores se expresan en µg Ti/gramo tejido seco. Se dan diferencias significativas entre todos los grupos. ** $p \leq 0,05$ vs grupo Control (0 mg/l); # $p \leq 0,05$ vs Tto 20 (20 mg/l); Δ $p \leq 0,05$ vs Tto 200 (200 mg/l).Tto 2000: 2000 mg/l.*

7 Discusión

En el presente trabajo se ha comprobado *in vivo* como dosis de protector solar comercial en concentraciones de 20 mg/l y 200 mg/l producen una respuesta antioxidante y detoxificante en *Mytilus galloprovincialis* caracterizada por un aumento de la expresión génica en el hepatopáncreas de Glutatión-S-transferasa (GST) y de citocromo P450 3A1 (CYP3A1), este último de forma significante solo en el grupo sometido a 200 mg/l (Tto 200), mientras que los cambios en la expresión de la enzima Catalasa (CAT) no llegan a ser significativos. El grupo experimental sometido a mayor concentración de protector solar (2000 mg/l) muestra daño oxidativo caracterizado por un notable aumento en hepatopáncreas tanto de los niveles de malondialdehído (MDA), indicador de peroxidación lipídica, como de carbonilación proteica, indicador de oxidación de proteínas. El daño oxidativo compromete la respuesta celular, posible razón por la que la expresión génica de enzimas detoxificantes desciende a niveles basales y dejan de responder a la crema solar en esta dosis.

Los bivalvos son organismos capaces de acumular grandes cantidades de metales pesados en sus tejidos, de tal manera que se induce la expresión de metalotioneínas las cuales van a fijar estos metales evitando y/o reduciendo su toxicidad (Viarengo et al.,

1999). También tienen un papel antioxidante, ya que las metalotioneínas pueden neutralizar los radicales hidroxilo (Viarengo et al. 2000). En el presente trabajo el aumento estadísticamente significativo observado en las expresiones de las metalotioneínas MT10 y MT20 en la glándula digestiva a partir de 200 mg/l de protector solar induce a pensar en el probable papel que juegan las nanopartículas de TiO_2, ya que el único metal pesado capaz de inducir la expresión de estas metalotioneínas presente en la crema solar usada es precisamente el titanio.

La bioacumulación de titanio en los tejidos de los sujetos experimentales ha sido verificada y aumenta a medida que lo hace la concentración de protector solar en el medio.

La respuesta al estrés oxidativo en branquias siguió un patrón similar al obtenido en hepatopáncreas pero más evidente y con respuestas más marcadas: Busquets Cortés et al. (2016) describió un incremento notable de la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), GST y CAT en el grupo experimental sometido a la dosis más baja de crema solar (20 mg/l). En dosis superiores la actividad de estas enzimas volvía a niveles basales, o incluso descendía en comparación con el grupo control en el caso de la CAT. La inhibición de la actividad acetilcolinesterasa y los altos niveles de malondialdehído (MDA) en la dosis más alta probada sugirió en ese trabajo, como en el caso del MDA en hepatopáncreas en el presente trabajo, un fallo de los sistemas antioxidante y daño oxidativo. La concentración de metalotioneínas en branquias también aumentó a medida que aumentaba la concentración de protector solar. De nuevo, se dio una respuesta más temprana en comparación con los resultados obtenidos en hepatopáncreas: hubo un aumento significativo de la concentración de metalotioneínas en la dosis más baja usada (20 mg/l), lo que sugiere que las branquias sean más sensibles al estrés oxidativo causado por el protector solar que el hepatopáncreas. Esta respuesta más intensa puede deberse a que las branquias son la vía de entrada de los tóxicos, por lo que se ven afectadas en primer lugar antes que el resto de tejidos del organismo.

Un probable agente causante del estrés oxidativo descrito es el dióxido de titanio (TiO_2) en forma de nanopartículas, cuyo papel en la formación de radicales libre de oxígeno ha sido discutido en el apartado 2 *Introducción*. Sánchez-Quiles y Tovar-Sánchez (2014) describieron al TiO_2 como el mayor agente oxidante que entra en aguas costeras debido

al uso de protector solar por parte de los bañistas, sin embargo el poder oxidante y la actividad fotocatalítica de estos nanomateriales varía según determinados parámetros físicos como el tamaño de la partícula o la estructura cristalina (Zhang et al. 2014). En el presente caso, el fabricante de la crema solar utilizada no especifica estos parámetros, lo que puede dificultar la reproducibilidad del experimento. Precisamente, la alta variabilidad observada en experimentos ecotoxicológicos con nanopartículas se debe, según ha sido hipotizado por Menard y colaboradores (2011), a la relación entre las características físico-químicas de las nanopartículas de TiO_2 y su efecto biológico.

Canesi et al. (2010) hallaron que la exposición aguda (24 horas) a nanopartículas de TiO_2 solo producía cambios notables en biomarcadores lisosomales y de estrés oxidativo en la glándula digestiva en altas concentraciones, de 1 a 5 mg/l, salvo en la actividad GST, en la cual constataron un aumento a 200 µg TiO_2/l. En nuestro grupo experimental Tto 2000, donde se alcanza una concentración de 280 µg TiO_2/l, la tendencia al alza se invierte y la expresión de GST vuelve a valores basales, posiblemente porque esta elevada concentración pone en compromiso la viabilidad del organismo.

Barmo et al. (2013) describió la respuesta antioxidante e inmune en *M. galloprovincialis* tras 96 horas de exposición a nanopartículas de TiO_2. En hepatopáncreas halló una respuesta contraria a la obtenida por nosotros respecto a GST: la expresión génica de GST disminuyó de forma considerable solo en la menor concentración de TiO_2 probada, 1 µg TiO_2/l y la actividad enzimática disminuyó en los grupos que trataron con 1 µg TiO_2/l y 10 µg TiO_2/l. En general, disminuyó la expresión de las enzimas antioxidantes relacionadas con el glutatión. En esas mismas concentraciones también disminuyó el mRNA codificante para la enzima CAT. Sin embargo, hallaron un aumento de la actividad CAT muy notable en los grupos expuestos a 1, 10 y 100 µg TiO_2/l. Esta diferencia entre la expresión génica y la actividad enzimática la achacan a eventos post-transcripcionales o diferentes niveles de expresión proteica. En comparación con los resultados de Canesi et al. (2010) llegaron a la conclusión que los bivalvos pueden hacer frente al estrés oxidativo si la concentración de TiO_2 es baja y el tiempo de exposición es largo.

En el caso del presente trabajo, otra fuente de variabilidad es la presencia de múltiples compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en la formulación usada. Por lo tanto, no

podemos responsabilizar a las nanopartículas de dióxido de titanio de una manera absolutamente afirmativa de los efectos observados. De hecho, se ha utilizado el titanio para determinar los niveles de exposición a la crema solar, ya que en base a los niveles de este metal encontrados en aguas costeras de Mallorca se ha calculado la concentración de crema utilizada.

El aumento de la expresión génica del CYP3A1, gen implicado en procesos de biotransformación de fase I, se ha relacionado con la exposición a PAHs (hidrocarburos aromáticos policíclicos) o PCBs (Bifenilos policlorados) en medios acuáticos y ha sido usado como biomarcador durante décadas (Zanette et al. 2013). Es posible que existan componentes orgánicos en los protectores solares comerciales que actúen como agonistas AHR (receptor de aril hidrocarburos) e induzcan la expresión de CYP3A1. Además, algunos de estos compuestos son prooxidantes y, por tanto, otra fuente de estrés oxidativo. Lacroix et al. (2015) demostraron como los bivalvos sometidos a contaminación crónica con hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) presentaron una respuesta adaptativa antioxidante caracterizada por un aumento en la glándula digestiva de la biotransformación (GST), defensas antioxidantes (CAT) y generación de NADPH, importante agente reductor.

Por último, una vez demostrado el impacto negativo de los protectores solares en *M. galloprovincialis*, cabe tener en cuenta las interacciones entre sus componentes a nivel ecotoxicológico para manufacturar en el futuro productos más respetuosos con el entorno. Farkas et al. (2015) demostró como la presencia de nanopartículas de TiO_2 reduce la biodisponibilidad del benzo(a)pireno (un hidrocarburo aromático policíclico cancerígeno) en *M. edulis* aunque la expresión de muchos biomarcadores no se redujeron, indicando que las nanopartículas de TiO_2 pueden actuar aumentando el estrés oxidativo. No siempre se da esta interacción nociva; de hecho, la co-exposición de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (un contaminante organoclorado) junto a las nanopartículas de TiO_2 no resulta en una toxicidad incrementada en *M. galloprovincialis* (Banni et al. 2016) .

En conclusión, el tratamiento agudo con una crema solar con titanio en su composición, en concentraciones similares a las encontradas de forma natural en aguas costeras, induce una situación de estrés oxidativo y un aumento de los mecanismos de

detoxificación y de captación de metales. Los protectores solares son una fuente de contaminación para el entorno marino y su liberación al medio acuático debería estar monitorizada. Es necesaria más investigación en este campo para desarrollar formulaciones con un impacto más reducido, en las que se tengan en cuenta las propiedades físicas de las nanopartículas usadas así como la interacción con otros componentes orgánicos o inorgánicos presentes en la formulación.

8 Bibliografía

Banni, Mohamed, Susanna Sforzini, Teresa Balbi, Ilaria Corsi, Aldo Viarengo, and Laura Canesi. 2016. "Combined Effects of N-TiO2 and 2,3,7,8-TCDD in Mytilus Galloprovincialis Digestive Gland: A Transcriptomic and Immunohistochemical Study." *Environmental Research* 145 (February): 135–44. doi:10.1016/j.envres.2015.12.003.

Barmo, Cristina, Caterina Ciacci, Barbara Canonico, Rita Fabbri, Katia Cortese, Teresa Balbi, Antonio Marcomini, Giulio Pojana, Gabriella Gallo, and Laura Canesi. 2013. "In Vivo Effects of N-TiO2 on Digestive Gland and Immune Function of the Marine Bivalve Mytilus Galloprovincialis." *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 132-133 (May): 9–18. doi:10.1016/j.aquatox.2013.01.014.

Bebianno, Maria J, Belisandra Lopes, Luís Guerra, Pascal Hoarau, and Ana M Ferreira. 2007. "Glutathione S-Tranferases and Cytochrome P450 Activities in Mytilus Galloprovincialis from the South Coast of Portugal: Effect of Abiotic Factors." *Environment International* 33 (4): 550–58. doi:10.1016/j.envint.2006.11.002.

Busquets Cortés, Andrea. 2016. "Análisis de biomarcadores como indicadores de estrés oxidativo en bivalvos expuestos a crema solar." http://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/1659.

Canesi, L., R. Fabbri, G. Gallo, D. Vallotto, A. Marcomini, and G. Pojana. 2010. "Biomarkers in Mytilus Galloprovincialis Exposed to Suspensions of Selected Nanoparticles (Nano Carbon Black, C60 Fullerene, Nano-TiO2, Nano-SiO2)." *Aquatic Toxicology* 100 (2): 168–77. doi:10.1016/j.aquatox.2010.04.009.

Canesi, Laura, Caterina Ciacci, Davide Vallotto, Gabriella Gallo, Antonio Marcomini, and Giulio Pojana. 2010. "In Vitro Effects of Suspensions of Selected Nanoparticles (C60 Fullerene, TiO2, SiO2) on Mytilus Hemocytes." *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 96 (2): 151–58. doi:10.1016/j.aquatox.2009.10.017.

D'Agata, Alessia, Salvatore Fasulo, Lorna J Dallas, Andrew S Fisher, Maria Maisano, James W Readman, and Awadhesh N Jha. 2014. "Enhanced Toxicity of 'Bulk' Titanium Dioxide Compared to 'Fresh' and 'Aged' Nano-TiO2 in Marine Mussels (Mytilus Galloprovincialis)." *Nanotoxicology* 8 (5): 549–58. doi:10.3109/17435390.2013.807446.

De Donno, A., D. Liaci, F. Bagordo, F. Lugoli, and G. Gabutti. 2008. "Mytilus Galloprovincialis as a Bioindicator of Microbiological Pollution of Coastal Waters: A Study Conducted in the Salento Peninsula (Italy)." *Journal of Coastal Research* 1 (January). Coastal Education and Research Foundation: 216–21. doi:10.2112/05-0463.1.

Dodd, Nicholas J F, and Awadhesh N Jha. 2009. "Titanium Dioxide Induced Cell Damage: A Proposed Role of the Carboxyl Radical." *Mutation Research* 660 (1-2): 79–82. doi:10.1016/j.mrfmmm.2008.10.007.

Farkas, J, S Bergum, E W Nilsen, A J Olsen, I Salaberria, T M Ciesielski, T Bączek, L Konieczna, W Salvenmoser, and B M Jenssen. 2015. "The Impact of TiO2 Nanoparticles on Uptake and Toxicity of Benzo(a)pyrene in the Blue Mussel (Mytilus Edulis)." *The Science of the Total Environment* 511 (April): 469–76. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.12.084.

Gasparro, F P. 2000. "Sunscreens, Skin Photobiology, and Skin Cancer: The Need for UVA Protection and Evaluation of Efficacy." *Environmental Health Perspectives* 108 Suppl (March): 71–78. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1637776&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Gérard-Monnier, D, I Erdelmeier, K Régnard, N Moze-Henry, J C Yadan, and J Chaudière. 1998. "Reactions of 1-Methyl-2-Phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation." *Chemical Research in Toxicology* 11 (10). American Chemical Society: 1176–83. doi:10.1021/tx9701790.

JOVIĆ, Mihajlo, Ana Stanković, Latinka Slavković-Beskoski, Ilija Tomić, Sandro Degetto, and Slavka Stanković. 2011. "Mussels as a Bio-Indicator of the Environmental Quality of the Coastal Water of the Boka Kotorska Bay (Montenegro)." *Journal of the Serbian Chemical Society* 76 (6). Serbian Chemical Society: 933–46. https://doaj.org/article/6ef393c9386b45fb9af1d4a2c1c14da9.

Koukouzika, N, and V K Dimitriadis. 2005. "Multiple Biomarker Comparison in Mytilus Galloprovincialis from the Greece Coast: 'lysosomal Membrane Stability, Neutral Red Retention, Micronucleus Frequency and Stress on Stress'." *Ecotoxicology (London, England)* 14 (4): 449–63.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16385739.

Lacroix, Camille, Gaëlle Richard, Catherine Seguineau, Julien Guyomarch, Dario Moraga, and Michel Auffret. 2015. "Active and Passive Biomonitoring Suggest Metabolic Adaptation in Blue Mussels (Mytilus Spp.) Chronically Exposed to a Moderate Contamination in Brest Harbor (France)." *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 162 (May): 126–37. doi:10.1016/j.aquatox.2015.03.008.

Masciangioli, Tina, and Wei-Xian Zhang. 2003. "Peer Reviewed: Environmental Technologies at the Nanoscale." *Environmental Science & Technology* 37 (5). American Chemical Society: 102A – 108A. doi:10.1021/es0323998.

Menard, Anja, Damjana Drobne, and Anita Jemec. 2011. "Ecotoxicity of Nanosized TiO2. Review of in Vivo Data." *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)* 159 (3): 677–84. doi:10.1016/j.envpol.2010.11.027.

Paredes, E, S Perez, R Rodil, J B Quintana, and R Beiras. 2014. "Ecotoxicological Evaluation of Four UV Filters Using Marine Organisms from Different Trophic Levels Isochrysis Galbana, Mytilus Galloprovincialis, Paracentrotus Lividus, and Siriella Armata." *Chemosphere* 104 (June): 44–50. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.10.053.

Sánchez-Quiles, David, and Antonio Tovar-Sánchez. 2014. "Sunscreens as a Source of Hydrogen Peroxide Production in Coastal Waters." *Environmental Science & Technology* 48 (16). American Chemical Society: 9037–42. doi:10.1021/es5020696.

Sánchez-Quiles, David, and Antonio Tovar-Sánchez. 2015. "Are Sunscreens a New Environmental Risk Associated with Coastal Tourism?" Environment International 83 (October): 158–70. doi:10.1016/j.envint.2015.06.007.

Serafim, Angela, Belisandra Lopes, Rui Company, Alexandra Cravo, Tânia Gomes, Vânia Sousa, and Maria João Bebianno. 2011. "A Multi-Biomarker Approach in Cross-Transplanted Mussels Mytilus Galloprovincialis." *Ecotoxicology (London, England)* 20 (8): 1959–74. doi:10.1007/s10646-011-0737-7.

Tovar-Sánchez, Antonio, David Sánchez-Quiles, Gotzon Basterretxea, Juan L Benedé, Alberto Chisvert, Amparo Salvador, Ignacio Moreno-Garrido, and Julián Blasco. 2013. "Sunscreen Products as Emerging Pollutants to Coastal Waters." *PloS One* 8 (6): e65451. doi:10.1371/journal.pone.0065451.

Tsui, Mirabelle M P, H W Leung, Tak-Cheung Wai, Nobuyoshi Yamashita, Sachi Taniyasu, Wenhua Liu, Paul K S Lam, and Margaret B Murphy. 2014. "Occurrence, Distribution and Ecological Risk Assessment of Multiple Classes of UV Filters in Surface Waters from Different Countries." *Water Research* 67

(December): 55–65. doi:10.1016/j.watres.2014.09.013.

Viarengo, A, B Burlando, M Cavaletto, B Marchi, E Ponzano, and J Blasco. 1999. “Role of Metallothionein against Oxidative Stress in the Mussel Mytilus Galloprovincialis.” *The American Journal of Physiology* 277 (6 Pt 2): R1612–19. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10600906.

Viarengo, A, B Burlando, N Ceratto, and I Panfoli. 2000. “Antioxidant Role of Metallothioneins: A Comparative Overview.” *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)* 46 (2): 407–17. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10774929.

Wang H, Wick R, Xing B. 2009. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al2O3 and TiO2 to the nematode Caenorhabditis elegans. Environ Pollut 157:1171–1177.

Xiong, Daowen, Tao Fang, Linpeng Yu, Xiaofeng Sima, and Wentao Zhu. 2011. “Effects of Nano-Scale TiO2, ZnO and Their Bulk Counterparts on Zebrafish: Acute Toxicity, Oxidative Stress and Oxidative Damage.” *The Science of the Total Environment* 409 (8): 1444–52. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.01.015.

Zanette, Juliano, Matthew J Jenny, Jared V Goldstone, Thiago Parente, Bruce R Woodin, Afonso C D Bainy, and John J Stegeman. 2013. “Identification and Expression of Multiple CYP1-like and CYP3-like Genes in the Bivalve Mollusk Mytilus Edulis.” *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 128-129 (March): 101–12. doi:10.1016/j.aquatox.2012.11.017.

Zhang, Jinfeng, Peng Zhou, Jianjun Liu, and Jiaguo Yu. 2014. “New Understanding of the Difference of Photocatalytic Activity among Anatase, Rutile and Brookite TiO2.” *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP* 16 (38). The Royal Society of Chemistry: 20382–86. doi:10.1039/c4cp02201g.

Zhu XS, Zhu I, Duan ZH, Qi RQ, Li Y, Lang YP. 2008. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (Danio rerio) early developmental stage. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng 43:278–284.