

MECANISMOS DE TOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN ORGANISMOS ACUÁTICOS

Analía Ale

ale.analia@gmail.com

Directora: Dra. Jimena Cazenave

Codirector: Fernando Román de la Torre

Lugar de realización: Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL), Laboratorio de Ictiología

Fecha de la defensa: 22 de marzo de 2019

RESUMEN

La creciente producción y utilización de las nanopartículas de plata (AgNP) por sus eficientes propiedades biocidas llevan a su liberación en los ambientes en cantidades desconocidas, siendo los sistemas acuáticos los sumideros finales. El objetivo general de este estudio fue comprender los mecanismos de toxicidad de las AgNP en organismos acuáticos. Para ello, llevamos a cabo ensayos *in vivo* y *ex vivo* (branquias) con peces de agua dulce y moluscos marinos. Se seleccionaron concentraciones de AgNP bajas y ambientalmente relevantes a partir de un stock comercial de nanoplatina coloidal (Nanotek S.A., nanArgen®).

Un primer ensayo consistió en la exposición *in vivo* de juveniles de peces *Porchilodus lineatus* (sábalo) a: 0 (control); 2.5 y 25 $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$ (renovaciones cada 48 h) durante 5 y 15 días. La acumulación de Ag total en los tejidos aumentó ante ambas concentraciones y tiempos de exposición según la siguiente secuencia: hígado>branquias>intestino>cerebro. El índice hepatosomático de los peces aumentó luego de ambos tiempos de exposición en el caso de la concentración de 25 $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$. Después de 5 días, aumentó la cantidad de glóbulos rojos, los niveles de concentración media de hemoglobina corpuscular y la cantidad de monocitos; mientras que pasados los 15 días de exposición aumentó la cantidad de glóbulos blancos y monocitos, y disminuyeron la hemoglobina corpuscular media y la cantidad de linfocitos. En el mucus aislado de la superficie corporal de los peces expuestos por 15 días a ambas concentraciones de AgNP, se observó una disminución de la cantidad de unidades formadoras de colonias de bacterias. En cuanto a los marcadores de estrés oxidativo, en el hígado de los peces hubo un aumento de todas las enzimas antioxidantes y disminución de la capacidad antioxidante luego de 15 días. Contrariamente, en las branquias se evidenció una inhibición de todas las enzimas luego de 5 días a 25 $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$, y peroxidación lipídica (LPO) a los 15 días de exposición. Además, luego de la exposición a la mayor concentración de AgNP se observaron alteraciones en los marcadores de costo energético: la glucosa y proteínas (Prot) plasmáticas aumentaron luego de 5 días, y el glucógeno hepático y muscular, y las Prot del músculo después de 15 días. Por otro lado, el análisis histológico de las branquias de los sábalo reveló una mayor cantidad de histopatologías y proliferación de células mucosas luego de 15 días a 25 $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$, lo cual sumado a la alteración de enzimas transaminasas deja en evidencia un

severo daño de este órgano vital. Por último, se llevó a cabo un análisis multivariado que brindó una visión holística de los resultados, y claramente separó y demostró un perfil fisiológico diferente de los peces expuestos a $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$ por 15 días. Además, ordenó los ejemplares según los diferentes tiempos de exposición.

Por otra parte, se llevó a cabo un ensayo *ex vivo* con branquias de juveniles de peces *Piaractus mesopotamicus* (pacú) y adultos de *Corydoras paleatus* (quitasueños) para exponerlas (medio de solución salina) a AgNP y AgNO₃. Se analizaron biomarcadores de estrés oxidativo, y mitigaciones de los mismos cuando estaban presentes ácidos húmicos (AH) en el medio. Los tratamientos fueron: solución salina (control); solución salina + 10 mg AH L⁻¹ (control AH); 100 $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$; 100 $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$ + 10 mg AH L⁻¹; 100 $\mu\text{g AgNO}_3 \text{ L}^{-1}$; 100 $\mu\text{g AgNO}_3 \text{ L}^{-1}$ + 10 mg AH L⁻¹. Luego de 1 h de exposición, en las branquias de pacú hubo un aumento de la actividad de la enzima antioxidante Catalasa en los tratamientos con AgNP y AgNO₃. En las branquias del quitasueños se vieron disminuidos los niveles de glutatión y la actividad de la enzima Glutatión-S-transferasa (GST) en el caso de la exposición a AgNO₃, y también aumentaron los niveles de LPO luego de la exposición a AgNP. Todos los efectos fueron atenuados cuando estaban presentes los AH en el medio.

Por último, se desarrolló un ensayo *in vivo* con el molusco marino *Mytilus galloprovincialis* como organismo test, el cual fue expuesto a: 0 (control), 1 $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$ y 10 $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$ (renovaciones cada 24 h) durante 96 h. Los resultados demostraron un aumento en la acumulación Ag en el tejido blando del bivalvo. Los hemocitos revelaron una disminución de la estabilidad de las membranas lisosomales luego de ambas concentraciones de AgNP, y un aumento de la frecuencia de micronúcleos. En la glándula digestiva se evidenció un aumento de la actividad enzimática de GST y de los niveles de LPO. Los niveles de metalotioneínas aumentaron en caso de la exposición a 10 $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$. Por último, los transportadores en las membranas ABC de las células de las branquias se vieron inhibidos en el caso de la menor concentración de AgNP.

Dado que la producción, uso y liberación creciente de AgNP son una amenaza real y emergente en los ecosistemas de agua dulce y marinos, la información generada en esta tesis representa un valioso aporte para propósitos de regulación y control ambiental.

ABSTRACT

FALTA TITULO EN INGLES

By The growing production of silver nanoparticles (AgNP) inevitably leads to their release in environments, where the aquatic ones always constitute the final sinks of these emergent substances. The main objective of this thesis was to understand the toxicity mechanisms of AgNP in aquatic organisms. For this purpose, assays were carried out using different biologic models (freshwater fish, marine mussels)

and kind of assays (in vivo, ex vivo gills). The AgNP were capable of been absorbed by organisms and accumulate in their tissues in a dose and time-dependent way. In fish, different toxic effects were registered such as oxidative stress generation in several tissues, alteration of hematological and immunological parameters, and energetic reserves mobilization. In mussels, besides, destabilization of hemocytes, metallothionein induction, genotoxicity, and damage in membrane transporters were evidenced. On the other hand, it has been demonstrated that toxic effects generated by AgNP could be attenuated when humic substances are present in the media. Overall, this thesis provides an integrative vision of the main toxicity mechanisms of AgNP in aquatic organisms. In this way, the information generated is relevant in order to contribute to the control and regulation goals, with the aim of protecting the environment and achieve the sustainability of the nanotechnology industry.