

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**“MECANISMOS DE TOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA  
EN ORGANISMOS ACUÁTICOS”**

**Analía Ale**

Directora: Dra. Jimena Cazenave

Co-director: Dr. Fernando Román de la Torre

Lugar de realización: Instituto Nacional de Limnología  
(INALI-CONICET-UNL)

**- 2018 -**

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer profundamente a la Universidad Nacional del Litoral por brindarme los espacios y recursos necesarios para transitar mi carrera universitaria. A la Facultad de Humanidades y Ciencias, para obtener mi título de grado de Licenciatura en Biodiversidad, y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas para transitar la carrera de posgrado de Doctorado en Ciencias Biológicas.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por otorgarme la beca que me hizo posible dedicarme a mis tareas académicas y llegar a esta instancia.

Al Instituto Nacional de Limnología, por brindarme el lugar de trabajo para desarrollar no sólo este proyecto, sino otros en los que tuve la suerte de participar desde que era estudiante de grado.

Al jurado, por su tiempo, interés y dedicación para evaluar esta tesis. En especial a Fernanda Simoniello, por su dedicación como consejera de estudios desde los inicios de la misma.

A lo más valioso que tuve transitando la carrea: el grupo humano. A mis directores: Jimena y Fernando. Jime, gracias por ser mi mentora académica y emocional durante todos estos años, por confiar en mí y darme tantas oportunidades desde que era alumna de grado. Por tu humildad, calidad humana, buena predisposición y paciencia te admiro como persona y profesional, y aprendo todos los días de tu ejemplo. Fer, gracias por ayudarme a abrir la cabeza con la experiencia nueva que fue trabajar con tu equipo, por tu paciencia, por compartirme tus conocimientos, por los momentos de risas vividos y también por alguna que otra pelea amistosa. También les agradezco inmensamente a otros mentores no oficiales en papeles. Carla, gracias infinitas por tu apoyo, amistad y cariño. Siempre fuiste y vas a ser un pilar emocional y académico para mí, en los buenos momentos, y los malos también que se diluyen por los millones de mates lavados compartidos en el box. Andrea, gracias por ser tan importante todos estos años, por tu humildad, buena predisposición, paciencia y buena onda “para adelante” de siempre. Mirta, gracias por todos estos años, por las palabras de aliento, las charlas, los mates y estar siempre predispuesta a ayudarme. Celeste, gracias por tu

espíritu “de maquinita” superador, ser tan eficiente, tan predispuesta en ayudarme cuando lo necesité, y a la vez por compartir una linda amistad que se formó rápidamente.

Al Laboratorio de Ictiología, en donde cada uno de sus integrantes fue de gran aporte para llegar a este momento. Por la paciencia, la sana convivencia, su ayuda y momentos compartidos.

A COIMBRA Group, por el otorgamiento de la beca que hizo posible la maravillosa estancia en Italia. A la Università degli Studi di Siena y a todos los integrantes del Dipartimento Scienze fisiche, della Terra e dell’ambiente por brindarme el lugar de trabajo y los recursos necesarios. Especialmente agradezco a mi directora Ilaria Corsi y a mi compañera Giulia Liberatori, por su dedicación, paciencia y cariño tan ameno.

A todos los que colaboraron para la producción de esta tesis: Gerardo López (Nanotek S.A.) por facilitarnos las nanopartículas de plata; a Martín Desimone y Juan Galdopórpura (IQUIMEFA-UBA-CONICET) por las caracterizaciones de las mismas.

A mi familia: mamá, papá, Eli y Toto, mi cuñado Guille, tíos, primos, mi abuela y *mi tata*, Marcos y mis amigos por su paciencia, apoyo y cariño incondicional.

## PUBLICACIONES ORIGINADAS A PARTIR DE ESTA TESIS

- **Ale A**, Liberatori G, Vannuccini ML, Bergami E, Ancora S, Mariotti G, Bianchi N, Galdopórpóra JM, Desimone MF, Cazenave J, Corsi I (EN REVISIÓN). Exposure to a nanosilver-enabled consumer product results in similar accumulation and toxicity of silver nanoparticles in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol*
- **Ale A**, Rossi AS, Bacchetta C, Gervasio S, de la Torre F, Cazenave J (2018). Integrative assessment of silver nanoparticles toxicity in *Prochilodus lineatus* fish. *Ecol Indic* 93: 1190-1198. DOI: 10.1016/j.ecolind.2018.06.023
- **Ale A**, Bacchetta C, Rossi AS, Galdopórpóra J, Desimone MF, de la Torre FR, Gervasio S, Cazenave J (2018). Nanosilver toxicity in gills of a neotropical fish: metal accumulation, oxidative stress, histopathology and other physiological effects. *Ecotox Environ Safe* 148: 976-984. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.11.072
- Bacchetta C, **Ale A**, Simoniello MF, Gervasio S, Davico C, Rossi AS, Desimone MF, Poletta G, López G, Monserrat JM, Cazenave J (2017). Genotoxicity and oxidative stress in fish after a short-term exposure to silver nanoparticles. *Ecol Indic* 76: 230-239. DOI: 10.1016/j.ecolind.2017.01.018

# ÍNDICE

<b>1. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....</b>	<b>1</b>
<b>2. RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 LAS NANOPARTÍCULAS .....</b>	<b>9</b>
3.1.1 Conceptos generales, características, tipos y aplicaciones .....	9
3.1.2 Riesgos emergentes .....	14
3.1.3 Destino en el ambiente acuático .....	15
<b>3.2 NANOPARTÍCULAS DE PLATA .....</b>	<b>19</b>
3.2.1 Características generales .....	19
3.2.2 Aplicaciones .....	20
3.2.3 Liberación al ambiente acuático .....	22
3.2.3.1 Fuentes de liberación y concentraciones estimativas .....	22
3.2.3.2 Destino en el ambiente acuático .....	23
3.2.4 Efectos tóxicos en los organismos acuáticos .....	26
3.2.4.1 Entrada y acumulación .....	28
3.2.4.2 Estrés oxidativo .....	29
3.2.4.3 Genotoxicidad .....	33
3.2.4.4 Metalotioneínas .....	34
3.2.4.5 Otros efectos tóxicos.....	35
3.2.5 Organismos test y biomarcadores .....	37
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
<b>5.1 Ensayos <i>in vivo</i> con <i>Prochilodus lineatus</i> .....</b>	<b>41</b>
5.1.1 Caracterización de las AgNP .....	41

5.1.2 Peces y aclimatación .....	42
5.1.3 Ensayo preliminar: Determinación de la CL <sub>50</sub> .....	43
5.1.4 Ensayo definitivo: Diseño experimental .....	43
5.1.5 Concentración de plata en agua y tejido .....	46
5.1.6 Parámetros morfométricos y hematológicos .....	46
5.1.7 Conteo de unidades formadoras de colonias bacterianas .....	48
5.1.8 Estrés oxidativo .....	48
5.1.9 Metabolitos plasmáticos y reservas energéticas .....	50
5.1.10 Análisis histológicos en branquias .....	51
5.1.11 Enzimas transaminasas en branquias .....	54
5.1.12 Análisis estadísticos .....	54
<b>5.2 Ensayos <i>ex vivo</i> de branquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i></b>	
<b>y <i>Corydoras paleatus</i> .....</b>	<b>55</b>
5.2.1 AgNP, sal de plata y sustancias húmicas .....	55
5.2.2 Peces y aclimatación .....	55
5.2.3 Diseño experimental .....	56
5.2.4 Estrés oxidativo .....	59
5.2.5 Análisis estadísticos .....	59
<b>5.3 Ensayos <i>in vivo</i> con el bivalvo marino <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....</b>	<b>60</b>
5.3.1 Caracterización de las AgNP .....	60
5.3.2 Moluscos y aclimatación .....	60
5.3.3 Diseño experimental .....	61
5.3.4 Concentración de plata en agua y tejido blando .....	63
5.3.5 Desestabilización de la membrana lisosomal .....	63
5.3.6 Test de micronúcleos .....	63
5.3.7 Estrés oxidativo .....	64
5.3.8 Metalotioneínas .....	65
5.3.9 Actividad de transportadores de membranas .....	66
5.3.10 Análisis estadísticos .....	66

<b>6. RESULTADOS</b>	67
<b>6.1 Ensayos <i>in vivo</i> con <i>Prochilodus lineatus</i></b>	67
6.1.1 Caracterización de las AgNP	67
6.1.2 Ensayo preliminar: Determinación de la CL <sub>50</sub>	69
6.1.3 Concentración de plata en agua y tejido	69
6.1.4 Parámetros morfométricos y hematológicos	71
6.1.5 Conteo de unidades formadoras de colonias bacterianas	73
6.1.6 Estrés oxidativo	74
6.1.7 Metabolitos plasmáticos y reservas energéticas	77
6.1.8 Análisis histológicos en branquias	79
6.1.9 Enzimas transaminasas en branquias	82
6.1.10 Análisis multivariado	83
<b>6.2 Ensayos <i>ex vivo</i> de branquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> y <i>Corydoras paleatus</i></b>	85
6.2.1 Estrés oxidativo	85
<b>6.3 Ensayos <i>in vivo</i> con el bivalvo marino <i>Mytilus galloprovincialis</i></b>	87
6.3.1 Caracterización de las AgNP	87
6.3.2 Concentración de plata en agua y tejido blando	88
6.3.3 Desestabilización de la membrana lisosomal	89
6.3.4 Test de micronúcleos	90
6.3.5 Estrés oxidativo	90
6.3.6 Metalotioneínas	91
6.3.7 Actividad de transportadores de membrana	92
<b>7. DISCUSIÓN</b>	93
<b>7.1 Ensayos <i>in vivo</i> con <i>Prochilodus lineatus</i></b>	93
7.1.1 Caracterización de las AgNP	93
7.1.2 Concentración de plata en agua y tejido	94
7.1.3 Parámetros morfométricos y hematológicos	96
7.1.4 Conteo de unidades formadoras de colonias bacterianas	98
7.1.5 Estrés oxidativo	99
7.1.6 Metabolitos plasmáticos y reservas energéticas	102

7.1.7 Análisis histológicos en branquias .....	104
7.1.8 Enzimas transaminasas en branquias .....	105
7.1.9 Análisis multivariado .....	106
<b>7.2 Ensayos <i>ex vivo</i> de branquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i></b>	
<b>    y <i>Corydoras paleatus</i> .....</b>	<b>108</b>
<b>7.3 Ensayos <i>in vivo</i> con el bivalvo marino <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....</b>	<b>112</b>
7.3.1 Concentración de Ag en agua y tejido blando .....	112
7.3.2 Desestabilización de la membrana lisosomal .....	114
7.3.3 Test de micronúcleos .....	115
7.3.4 Estrés oxidativo .....	116
7.3.5 Metalotioneínas .....	117
7.3.6 Actividad de transportadores de membrana .....	118
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>120</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>122</b>



---

## 1. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

**ACAP:** *antioxidant capacity against peroxiles radicals*, capacidad antioxidante contra radicales peroxilos

**ACP:** análisis de componentes principales

**AgNP:** nanopartículas de plata

**AH:** ácidos húmicos

**ALT:** alanino-aminotransferasa

**AST:** aspartato-aminotransferasa

**CAT:** catalasa

**CL<sub>50</sub>:** concentración letal 50

**CM:** células mucosas

**CMHC:** concentración media de hemoglobina corpuscular

**Col:** colesterol

**DI:** distancia interlamelar

**DML:** desestabilización de la membrana lisosomal

**EDS:** *energy dispersive spectroscopy*, análisis de energía dispersiva

**EEP:** espesor del epitelio basal

**ELS:** espesor de laminillas secundarias

**FC:** factor de condición

**Gla:** glucosa

**GIB:** glóbulos blancos

**Glo:** glucógeno

**GIR:** glóbulos rojos

**GPx:** glutatión peroxidasa

**GR:** glutatión reductasa

**GSH:** glutatión reducido

**GSSG:** glutatión oxidado

**GST:** glutatión S-transferasa

**Hb:** hemoglobina

**HCM:** hemoglobina corpuscular media

**Ht:** hematocrito

**IHS:** índice hepato-somático

**I<sub>org</sub>:** índice del órgano

**I<sub>pr</sub>:** índice del patrón de reacción

**LE:** longitud estándar

**LLS:** longitud de laminillas secundarias

**LPO:** *lipid peroxidation*, peroxidación lipídica

**LT:** longitud total

**MN:** micronúcleos

**MT:** metalotioneínas

**NM(s):** nanomaterial(es)

**NP(s):** nanopartícula(s)

**PAGE:** *proportion of secondary lamellae available for gas exchange*, proporción de la laminilla disponible para el intercambio gaseoso

**Prot:** proteínas

---

**ROS:** *reactive oxygen species*,  
especies reactivas de oxígeno

**SS:** solución salina

**TEM:** *transmission electron  
microscopy*, microscopía de  
transmisión electrónica

**SEM:** *scanning electron microscopy*,  
microscopía electrónica de barrido

**SOD:** superóxido dismutasa

**Trig:** triglicéridos

**UFC:** unidades formadoras de  
colonias de bacterias

**VCM:** volumen corpuscular medio

---

## 2. 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 nanoplate 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  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$ . Respecto a las mediciones hematológicas, 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 (superóxido dismutasa, catalasa -CAT-, glutatión S-transferasa -GST-, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa) 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 (empleando una solución salina como medio) a AgNP y AgNO<sub>3</sub>. Se analizaron efectos tóxicos a través de biomarcadores de estrés oxidativo, y a la vez posibles 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<sup>-1</sup> (control AH); 100  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$ ; 100  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  + 10 mg AH L<sup>-1</sup>; 100  $\mu\text{g AgNO}_3 \text{ L}^{-1}$ ; 100  $\mu\text{g AgNO}_3 \text{ L}^{-1}$  + 10 mg AH L<sup>-1</sup>. Luego de 1 h de exposición, en las branquias de pacú hubo un aumento de la actividad de la enzima antioxidante CAT en los tratamientos con AgNP y la sal de plata. Por su parte, en las branquias del quitasueños se vieron disminuidos los niveles de glutatión y la actividad de la enzima GST en el caso de la exposición a AgNO<sub>3</sub>, 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  $\mu\text{g AgNPL}^{-1}$ . 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.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis permitieron obtener una visión amplia e integradora de los efectos tóxicos que provocan concentraciones subletales y ambientalmente relevantes de AgNP. Las nanopartículas metálicas fueron capaces de ser capturadas por las células de los organismos y bioacumularse, independientemente del organismo test (peces o moluscos) y el medio de dispersión (agua dulce o agua de mar). También se comprobó, en el caso de los peces, que son capaces de afectar la composición del mucus, convirtiéndose en una amenaza para las comunidades de bacterias benéficas que viven sobre la superficie del organismo. Por otro lado, el mecanismo principal que explica los efectos tóxicos fue el estrés oxidativo, ya sea por la inducción o inhibición de las enzimas antioxidantes, agotamiento del glutatión, u ocurrencia de daño oxidativo en lípidos. El hígado de los peces, y la glándula digestiva en los moluscos fueron los órganos blanco de las AgNP. Por su parte, también las branquias de los peces resultaron un tejido clave para evaluar los efectos tóxicos en donde se evidenciaron tanto respuestas de defensa (proliferación de células de mucus) como daños a nivel estructural (histopatologías, transaminasas).

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**

The growing production and use of silver nanoparticles (AgNP) due to their efficient biocides properties, inevitably lead to the release to environments in unknown amounts, where the aquatic systems always constitute the final sinks. The main objective of the present study was to investigate the toxicity mechanisms of AgNP in aquatic organisms. For this purpose, *in vivo* and *ex vivo* (gills) assays were carried out with freshwater fish and marine mussels. Low and environmentally relevant AgNP concentrations were selected from a commercial stock of colloidal nanosilver (Nanotek S.A., nanArgen®).

The first assay was carried out with the *in vivo* exposure of *Porchilodus lineatus* (sábalo) juveniles to: 0 (control); 2.5 and 25  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  (renewals each 48 h) for 5 and 15 days. Total Ag accumulation increased after both concentrations and times of exposure according to the following sequence: liver>gills>intestine>brain. The hepatosomatic index augmented after both times of exposures to 25  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$ . Regarding the hematology, after 5 days the red blood cells, the mean cell hemoglobin concentration, and the monocytes amount increased; meanwhile after 15 days of exposure, the amount of white blood cells and monocytes increased, and the mean cell hemoglobin and the lymphocytes amount decreased. In the mucus at the surface layer of fish exposed to both AgNP concentrations for 15 days, a decrease of bacteria colony forming units was observed. With respect to oxidative stress biomarkers, in the liver of fish an induction of all antioxidant enzymes was evidenced (superoxide dismutase, catalase -CAT-, glutathione S-transferase -GST-, glutathione reductase and glutathione peroxidase), and a decrease of ACAP levels after 15 days. On the contrary, in the gills of fish an inhibition of all antioxidant enzymes was observed in the case of the exposure to 25  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  for 5 days, and also after 15 days, lipid peroxidation (LPO) occurred. Moreover, after the exposure to the highest AgNP concentration changed the energetic reserves: plasmatic glucose and proteins (Prot) augmented after 5 days, and the hepatic and muscular glycogen and the muscular Prot increased after 15 days of exposure. On the other hand, the histological analysis in the gills of fish revealed a major amount of histopathologies and a mucus cells proliferation after 15

---

of exposure to 25  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$ . Those results, in addition to the altered values of transaminases activities, evidenced serious damage in this vital organ. Lastly, a multivariate analysis was performed in order to obtain a holistic view of the results, and it clearly separated and showed a different physiologic profile in the case of fish exposed to 25  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  for 15 days. Besides, it ordered the individuals according to the different times of exposure.

Secondly, an *ex vivo* assay was performed with gills of juveniles of *Piaractus mesopotamicus* (pacú) and adults of *Corydoras paleatus* (quitasueños) fish in order to expose the organ (using a saline solution as media) to AgNP and AgNO<sub>3</sub>. The toxic effects were analyzed through oxidative stress biomarkers, and also potential mitigations were evaluated when humic acids (HA) were present in the media. The treatments were: saline solution (control); saline solution + 10 mg HA L<sup>-1</sup> (HA control); 100  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$ ; 100  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  + 10 mg HA L<sup>-1</sup>; 100  $\mu\text{g AgNO}_3 \text{ L}^{-1}$ ; 100  $\mu\text{g AgNO}_3 \text{ L}^{-1}$  + 10 mg HA L<sup>-1</sup>. After 1 h of exposure, in the gills of *P. mesopotamicus* the CAT activity increased in the case of AgNP and silver salt exposures. From their part, in the gills of *C. paleatus* the glutathione levels and GST activity were decreased in the case of the AgNO<sub>3</sub> exposure, and also an increase of LPO levels was observed after the AgNP exposure. All effects were mitigated when the HA were present in the media.

Lastly, an *in vivo* assay was carried out with the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as test organism, which was exposed to: 0 (control), 1  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  and 10  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  (renewals each 24 h) with natural seawater (NSW) for 96 h. The results showed an increase in Ag accumulation in the soft tissue of the bivalve. The hemocytes revealed a decreased of the lysosomal stability after both AgNP exposures, and also an increase of micronucleus frequency was observed. In the digestive gland of mussels, the GST activity augmented and also the LPO levels. The metallothionein induction was observed in the case of the 10  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$ -exposure. The efflux activity mediated by the ABC transporters was inhibited in the gills of the mussels exposed to the lowest AgNP concentration.

The obtained results through the development of this thesis allowed the achievement of an integral and wide overview of the toxic effects generated by sublethal and

---

environmentally relevant AgNP concentrations. The metallic nanoparticles were captured and bioaccumulated by organism's cells, independently of the test organism (fish or mussel) and dispersive media (freshwater or seawater). Moreover, in the case of fish, it was corroborated that AgNP altered the mucus composition and become a threat for the beneficial bacteria communities living on the organism surface. On the other way, the main toxicity mechanism that explained the toxic effects was the oxidative stress; because of the induction or inhibition of the antioxidant enzyme defense system, glutathione depletion, or oxidative damage occurrence. The liver of fish and the digestive gland of mussels were the target organs with respect to the AgNP. From their part, the gills of fish were also a key tissue for evaluating toxic effects; defense responses (mucus cells proliferation) and structural damage (histopathologies and transaminases activities) were evidenced.

Due to the increasing production, use, and release of AgNP, these particles are an actual threat to freshwater and marine environments, and all information generated through this thesis represents an important contribution regarding regulation and environmental control purposes.



### 3. INTRODUCCIÓN

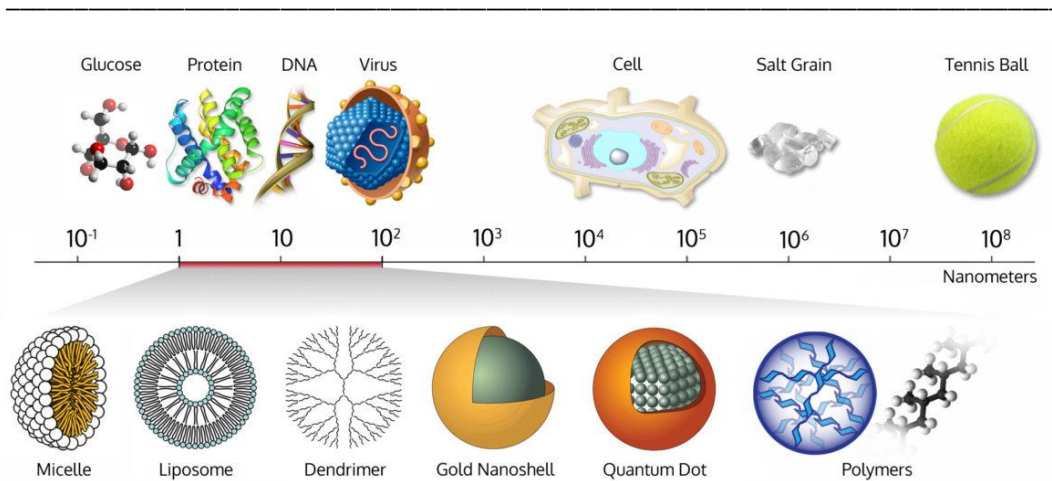
#### 3.1 Las nanopartículas

##### 3.1.1 Conceptos generales, características, tipos y aplicaciones

La "Nanotecnología" y el uso de nanomateriales (NM) es un área relativamente nueva de la ciencia y la tecnología. El término "nano" deriva del griego "enano". El primer invento clave que se le podría atribuir a la nanotecnología es el "microscopio de efecto túnel", que permite tomar imágenes de superficies a nivel atómico [1].

Se define como Nanotecnología a la manufactura controlada o modificada de materiales a escala nanométrica (nm) focalizada en el diseño, la síntesis, caracterización y aplicación de materiales e instrumentos. Esta rama del conocimiento es una subclasificación de la tecnología en la ciencia coloidal, biología, física, química y otros campos científicos que incluyen el estudio del fenómeno y manipulación de materiales a nanoescala [2], [3]. El desarrollo de esta ciencia tuvo como resultado novedosos materiales y sistemas con características físicas, químicas y biológicas únicas debidas a su tamaño y estructura. Las nanopartículas (NP) hoy en día se consideran indispensables para el desarrollo de la industria debido a sus múltiples aplicaciones [4].

Todavía no existe acuerdo internacional que defina formalmente a los NM y las NP. Las NP suelen definirse como un material cuya superficie cuenta al menos con una dimensión de 1 a 100 nm [5], [6], [7]. Los NM pueden hacer referencia a materiales como nanoplates o nanoclusters (con una dimensión), nanohilos o nanotubos (dos dimensiones), o nanopartículas (3 dimensiones). La Figura 1 muestra referencias de la escala nanométrica en donde están representadas las NP o NM.



**Figura 1.** Representación de la escala nanométrica. Fuente: WichLab ([www.wichlab.com/nanometer-scale-comparison-nanoparticle-size-comparison-nanotechnology-chart-ruler-2/](http://www.wichlab.com/nanometer-scale-comparison-nanoparticle-size-comparison-nanotechnology-chart-ruler-2/))

La gran mayoría de las NP manufacturadas están disponibles en varias formas y tamaños. Actualmente se producen en cifras de miles de toneladas y forman parte de una gran variedad de productos, incluyendo desde electrónicos, automóviles y naves espaciales, hasta productos para deporte, higiene, construcción y medicina. Las NP pueden sintetizarse natural o artificialmente [8]. Una forma de clasificarlas es según las categorías:

- (1) NP no metálicas inorgánicas (de sílice, cerio, calcio)
- (2) Metales y aleaciones de metales (oro, plata, aluminio, titanio, cobre, cobalto)
- (3) NM basados en carbono (fulerenos, nanotubos de carbono, nanofibras de carbono, grafenos)
- (4) Nanopolímeros y dendrímeros (nanopartículas poliméricas, nanotubos de polímeros, nanocables, nanocelulosa, films poliméricos nanoestructurados)
- (5) *Quantum dots* (telururo de cadmio, seleniuro de cadmio, *quantum dots* cuánticos sin Cd)

La producción de NM puede llevarse a cabo, en general, según tres métodos:

- (1) Biológicos (producción de NP por microorganismos)
- (2) Químicos (por ejemplo, por deposición del vapor o reducción química)
- (3) Físicos (por ejemplo, por deposición de vapor química, producción de films)

Las propiedades y el comportamiento de los materiales a nanoescala difieren sustancialmente de aquellos con escala micrométrica. Particularmente, los NM se destacan por sus propiedades eléctricas, ópticas y magnéticas. Los dos factores básicos que hacen que las NP marquen la diferencia son: los efectos de su superficie (propiedades que le dan los átomos que forman parte de su superficie) y los efectos cuánticos. Estos dos factores afectan la reactividad química de los materiales, así como determinan sus propiedades mecánicas, ópticas, eléctricas y magnéticas [9].

Una gran ventaja de los NM es el aumento de la relación superficie-volumen; las NP presentan un área superficial específica mucho mayor que las contrapartes del mismo material (por ej. sales de nitrato de plata, óxido de silicio). El radio superficial es lo que determina su reactividad química, la cual es aproximadamente 100 veces mayor que en las micropartículas [10].

La posibilidad de modificar el tamaño fácilmente de las NP también es otra gran ventaja. Actualmente, la nanotecnología se aplica a un amplio espectro de campos científicos (biotecnología, medicina, farmacia, ecología, electrónica, etc.), e inclusive hay grandes avances respecto a su implementación en la agricultura, medicina veterinaria y en la industria de alimentos [11]. Los tipos de NP de mayor interés son: nanopartículas de plata, de oro, de zinc, selenio, de dióxido de titanio y los nanotubos de carbono. El área de la bioingeniería es particularmente donde las NP tienen la mayor cantidad de aplicaciones para test de diagnósticos, es decir como herramienta para detectar enfermedades y para terapias farmacológicas (principalmente por delivery de drogas y deposición en el cuerpo humano) [12], [13].

Otro sector importante donde se ha implementado la nanotecnología es el de computación. En las últimas décadas la “nueva generación de computadoras” se ha convertido en un nuevo fenómeno; se trata de computadoras que utilizan los NM como componentes elementales para incrementar la eficiencia y el ahorro de energía. La aplicación de una nueva generación de catálisis construidas a base de nanoestructuras resultó en una gran reducción de consumo de energía [14].

El agregado de NP en materiales, como pinturas (para naves espaciales, barcos) permite otorgarle al producto final propiedades bactericidas, anticorrosivas y de defensa contra

rayos UV. De acuerdo con la Comisión Europea [15], la manufacturación global de NM está cerca de 11.5 millones de toneladas, lo que es equivalente a 200 billones por año; Asia presenta el mayor mercado global de NP (~34%), seguido por Norteamérica (~31%) y Europa (~30%). La Tabla 1 detalla el mercado global de diferentes tipos de NP en el año 2015 (con valores predichos hasta el año 2025), con un alto caudal de producción para las NP de dióxido de titanio, óxido de zinc, dióxido de sílice y nanotubos de carbono; y una menor producción para otras NP como las de plata, de cobre, oro, grafeno, níquel y nanocelulosa.

Producción	Nanopartícula	Volumen de producción global mínima (toneladas)	Volumen de producción global máxima (toneladas)
<b>De alto volumen</b>	Dióxido de titanio	60.000	150.000
	Óxido de zinc	32.000	36.000
	Dióxido de sílice	185.000	1.400.000
	Dióxido de aluminio	5.000	10.100
	Nanotubos de carbono	1.550	1.950
<b>De bajo volumen</b>	Quantum dots	4.5	9
	Óxido de cobre	290	570
	Plata	135	420
	Nanocelulosa	400	1.350
	Óxido de cobalto	5	<10
	Oro	1	3
	Óxido de magnesio	15	30
	Óxido de manganeso	2	3.5
	Níquel	5	20

**Tabla 1.** Mercado global de los NM (modificado de Pulit-Prociak & Banach [8])

Algunos tipos de NP y sus aplicaciones se describen en la Tabla 2 según “The Woodrow Wilson International Center for Scholars” ([www.nanotechproject.org/inventories/consumer/](http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/)), si bien los usos continuamente cambian y se expanden a otras áreas comerciales.

Nanopartícula	Aplicación
Dióxido de aluminio	Pulidos de ópticas, cosméticos e indumentaria
Fulerenos	Almacenamiento de hidrógeno, delivery de drogas, terapéuticos, coadyuvantes y pigmentos, lubricación y cosmética
Nanotubos de carbono	Almacenamiento de hidrógeno, delivery de drogas, textiles, electrónicos, purificación de agua, equipamiento deportivo
Cerámicos	Electrónicos, antioxidantes, pulido de autos
Cobre u óxido de cobre	Lubricación de aditivos de aceite, procesadores electrónicos y de computadoras, coadyuvante conductores, tintas para impresiones, cremas "anti-age", acondicionadores de piel, suplementos minerales
Oro	Delivery de drogas, inmunohistoquímica, detección de peligros biológicos, suplementos minerales
Óxido de hierro	Ultrafiltración y oxidación reducción catalítica
Sulfato de hierro	Eliminación de pesticidas organoclorados en agua potable
Nanocristales	Delivery de drogas
Quantum dots	Imágenes médicas, fotónica
Sílice	Dispositivos ópticos y para óptica, pinturas corrosivas, cosmética
Plata	Bactericida en tratamiento de aguas, telas, indumentaria, juguetes blandos, utensilios de cocina, teclados de computadora, contenedores para almacenar comida, productos para bebés, pasta dentífrica
Dióxido de titanio	Pinturas, bronceadores, cosméticos, capacitores, materiales de construcción, catálisis, limpieza de aire, productos contra bacterias, virus, algas, hongos, equipamientos deportivos
Nano-vitaminas	Vitamina E, comidas, brebages, cosmética, vitaminas B12
Óxido de zinc	Bronceadores, cosméticos, limpiador de cosméticos, desodorantes para pies, pulido de autos

**Tabla 2.** Algunas aplicaciones de las NP o NM (modificado de Shaw & Handy [16]).

---

### 3.1.2 Riesgos emergentes

A pesar de que la mayoría de los NM han sido utilizados en un contexto moderno de investigación en la última década, hoy en día existe un amplio debate acerca de los riesgos y beneficios de muchos materiales nanofacturados y productos de consumo que se ofrecen en el mercado de manera constante [17]. En este contexto, por su parte, los ambientes acuáticos constituyen siempre los sumideros finales de las NP [18].

La manufacturación, uso y liberación de los NM han llevado a la necesidad de una evaluación de los riesgos en los ecosistemas, incluyendo a los humanos. Actualmente no existen datos concretos y fiables acerca de la concentración de NM en los ambientes en ninguna de sus formas fisicoquímicas, o sobre cómo se distribuyen en ellos. Sólo se han empleado unos pocos modelos para estimar la cantidad y carga de liberaciones potenciales de NP [19]. Por su parte, el desarrollo de técnicas para medir y caracterizar los NM en la atmósfera y ambientes acuáticos y terrestres es una prioridad para facilitar esta cuantificación y estimación de riesgos. Esto resulta particularmente crítico, dado que las NP representan un estado supramolecular intermedio del estado de la materia, con un tamaño que se encuentra entre las moléculas y los sólidos gruesos [20].

Los métodos clásicos para predecir riesgos son limitados cuando se aplican a los NM, dado que la toxicidad se ha clasificado según la porción soluble del contaminante [21]. Sin embargo, esta asunción debe tomarse con cautela dado que también influyen factores intrínsecos de las NP como su comportamiento y biodisponibilidad. Claramente, se necesita de la interdisciplinariedad de biólogos, químicos, físicos y ecotoxicólogos en NM. Una vez que los escenarios ambientales estén caracterizados, los organismos expuestos deben ser identificados urgentemente. Las respuestas biológicas cuantificables por parte de organismos test deben ser estudiadas para identificar los potenciales efectos tóxicos e identificar situaciones de vulnerabilidad. Sólo cuando se hallan asentado los riesgos de exposición y efectos de las NP, su evaluación será completa [22].

### 3.1.3 Destino en el ambiente acuático

Desde hace varios años (aproximadamente desde el 2004) la discusión acerca del destino de las NP se ha centrado en sus propiedades fisicoquímicas en ambientes acuáticos naturales, y se llegó al acuerdo de la necesidad de caracterizar las siguientes propiedades: composición química, masa, número de partícula y concentración, área superficial, distribución (incluyendo dispersión de la partícula primaria y la naturaleza de cualquier agregado), carga superficial/potencial  $z$ , naturaleza del agente "coating"/coadyuvante, estabilidad y solubilidad [22].

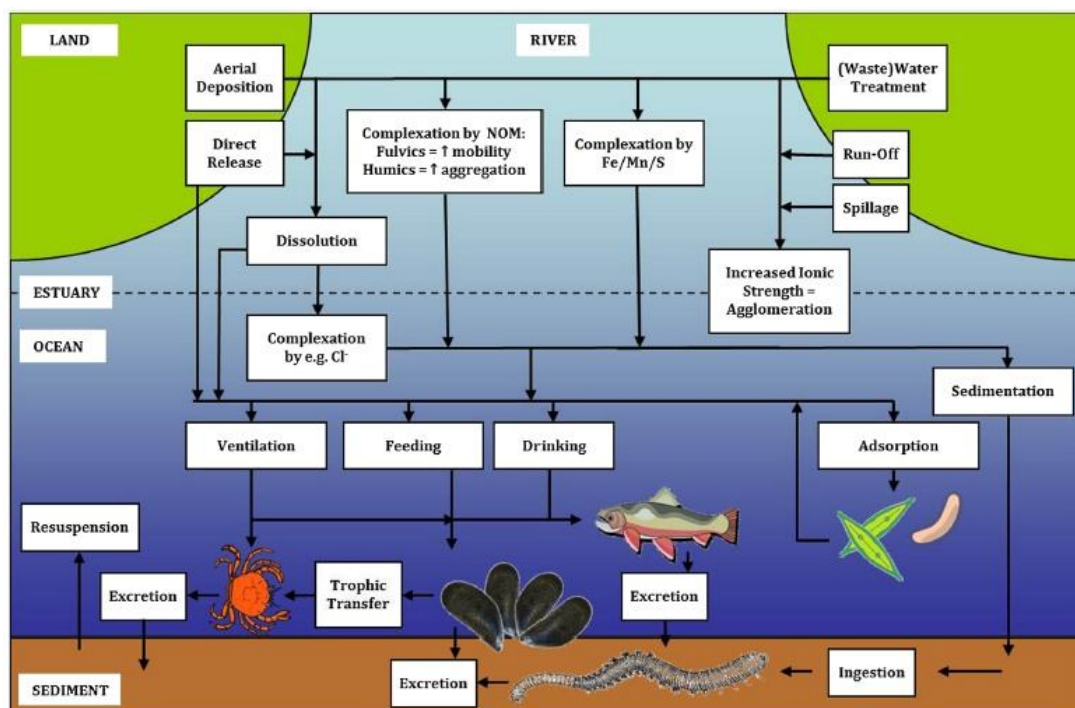
Las NP metálicas están bien caracterizadas en un trabajo de revisión desarrollado por Baker et al. [23]. Uno de los principales factores que influyen en su destino en los ambientes es la capacidad de disolución. Por ejemplo, las nanopartículas de cerio son mayormente insolubles [24], las de cobre muestran una disolución en  $\text{Cu}^{2+}$  [25] y las nanopartículas de plata (AgNP) se disuelve en el ion  $\text{Ag}^+$  [26]. El promedio de disolución, sin embargo, a la vez depende de un número de factores como el tamaño de partícula, el tipo de coating y el medio de dispersión. Por ejemplo, respecto a las nanopartícula de zinc, la disolución puede ser más del doble que las micropartículas [27]. Como se mencionó anteriormente, la tasa de disolución de una NP es una aproximación cuantificable de los efectos tóxicos que provocaría su exposición, si bien no es suficiente.

Los ambientes marinos son más alcalinos, tienen una mayor fuerza iónica y una gran variedad de coloides y materia orgánica que los dulceacuícolas. Las NP llegan a los ecosistemas marinos por vías directas (deposición aérea, efluentes, vertidos o esorrentías) o indirectas (a través de los ríos). En las zonas costeras, en comparación con el océano, la concentración de materia orgánica es mayor [28], [29]. Los océanos exhiben cambios en sus características fisicoquímicas que influyen en la química y agregación de los coloides. Por ejemplo, es bien sabido que la temperatura cambia con la profundidad, y a su vez la estratificación en función de la profundidad puede presentar diferentes grados de salinidad [29]. También constituye un riesgo la acumulación de las NP en las microsuperficies (*microlayers*) oceánicas, donde la tensión superficial y la viscosidad podrían atrapar a las NP dentro de estas capas [30], [31]. Hasta la fecha son

pocos los estudios que han investigado cómo los cambios de factores abióticos (pH, fuerza iónica, presencia de ligando orgánicos) influyen en la toxicidad de las NP.

La Figura 2 esquematiza el comportamiento de las NP en el agua de mar según Baker et al. [23]. La dinámica es sumamente compleja. En primera instancia, el tamaño, forma y tipo de capping juegan un rol fundamental en la estabilidad o aglomeración; por lo tanto, estas características también determinarán la biodisponibilidad de las NP por parte de los organismos acuáticos. La cinética de las NP en un cuerpo de agua dulce, como un río, puede derivar en la formación de complejos y agregados con la materia orgánica natural. A medida que la fuerza iónica aumenta, camino a estuarios y océanos (por lo tanto, el potencial  $z$  disminuye), las NP tienden a agregarse y así sedimentarse rápidamente. Esto sería de importancia para los organismos que componen el bentos. Sin embargo, las NP pueden volver a resuspenderse por actividad de los organismos que habitan en la columna de agua (como los filtradores cuando se alimentan).

Las cuatro rutas principales por las cuales las NP interaccionarían con los organismos son: (1) adsorción en su superficie (celular, del órgano o corporal), (2) internalización celular, (3) disolución de iones provenientes de la NP, y (4) propiedades intrínsecas por ser “nano”.



**Figura 2.** Fuentes de liberación de NP, comportamiento, absorción y rutas potenciales en los ambientes marinos (Baker et al. [23]).



La agregación de las NP en los medios acuáticos es la tendencia más común, y la magnitud de esos agregados dependerá de la carga superficial, la forma de la partícula y el tamaño, además del pH del medio en que se encuentran. En los ambientes marinos con salinidad creciente, y por lo tanto mayor fuerza iónica, las NP sufren una reducción de movilidad electroforética y son propensas a la agregación [26]. También la agregación depende de la concentración de las NP, es decir la cantidad disponible para interactuar [32], [33]. Los coatings hechos de citrato, polivinilpirrolidona (PVP) y goma arábica [34] son utilizadas para prevenir la aglomeración y aumentar la dispersión [35] dado que proveen una barrera anti-aglomeración con potencial de fuerzas de van der Waals [36]. La agregación reduce el área superficial, y por lo tanto, la disolución potencial (sobre todo a altas concentraciones de NP). Sin embargo, el capping también ejerce sus efectos al reducir la disolución, por lo que las NP con o sin capping se comportarán de manera diferente en los ambientes acuáticos (sobre todo en los marinos).

El tamaño de NP determina cuáles superficies serán capaces de penetrar, por lo que es un factor determinante en la ruta a seguir una vez que llegan a los ambientes acuáticos. Se ha reportado una correlación inversa entre el tamaño de algunos tipos de NP y citotoxicidad *in vitro* [37], [38], [39], [40], [41], [42]. Las NP más pequeñas penetran en las células de los organismos a través de la pinocitosis, mientras que las más grandes por fagocitosis. Algunas NP inclusive son capaces de crear su propio canal de membrana [43]. Como se mencionó antes, también el tamaño afecta el grado de disolución y la capacidad de agregación. Los cationes disueltos en agua salina generan fácilmente complejos (por ejemplo, aniones cloros en agua de mar), por lo que los organismos marinos quedan vulnerables a absorberlos rápidamente. Por esto, dichos organismos son más susceptibles a absorber las NP y la disolución se generaría *in situ* [44].

La forma es otro factor que puede afectar el grado de toxicidad. Los nanocables o nanohilos de nanopartículas de plata y sílice resultaron ser más tóxicos en comparación a las nanoesferas, debido a que interactúan más fácilmente con membranas celulares (y no pueden ser atrapadas por mecanismos de endocitosis) [45], [46], [47].

El tipo de capping también es un factor importante que determina los potenciales efectos tóxicos de las NP sobre los organismos. Mehennaoui et al. [48] hallaron una

correlación positiva entre el tipo de coadyuvante utilizado en AgNP y nanopartículas de oro y sus efectos tóxicos sobre el crustáceo *Gammarus fossarum* (mientras que el tamaño no resultó ser un factor importante). Los autores explican que los coatings orgánicos (como el polietilenglicol) les proveen a las NP gran estabilidad al prevenir su interacción con el medio que la rodea. Por lo tanto, el tipo de coating también determina la predisposición de las NP a aglomerarse (o en su defecto, mantenerse estable en el medio de disolución).

## 3.2 Nanopartículas de plata

### 3.2.1 Características generales

Dentro de las NP, las nanopartículas de plata o nanoplata (AgNP) se convirtieron en el nanomaterial fabricado con mayor y más rápido crecimiento respecto a sus aplicaciones comerciales por sus características excepcionales como biocida [49]. Se tratan, por lo general, de nanopartículas con dimensiones menores de 100 nm formadas por 20-15.000 átomos de Ag [50]. La base de datos "Nanodatabase" ([www.nanodb.dk](http://www.nanodb.dk)) identificó 442 productos comerciales que contienen AgNP en el año 2018. Se estima que su producción se encuentra en el rango de 0.6-55 en Europa, y 5.5-550 toneladas anuales en el mundo entero [52]. Estas NP son las más utilizadas en la categoría de salud y "fitness" según el "International Center for Scholar and Project on Emerging Nanotechnologies" ([www.wilsoncenter.org](http://www.wilsoncenter.org)). Las principales ventajas que han otorgado a las AgNP, además de ser agente antimicrobiano, se deben a sus propiedades ópticas, eléctricas y térmicas, que las hacen un material atractivo para catálisis, y aplicaciones biotecnológicas y biológicas [53], [54]. Por otra parte, a nivel de producción, los fabricantes se ven beneficiados respecto a los costos dado que las AgNP minimizaron la cantidad de plata total en comparación a otras formas como el nitrato de plata [55].

Al igual que otras NP, existen estudios que comprueban que la toxicidad de las AgNP es inversamente proporcional a su tamaño. Los factores que contribuyen a este fenómeno son: (1) las AgNP más pequeñas exhiben una mayor capacidad de circular a través de las membranas plasmáticas hacia la célula, (2) una vez internalizadas, tiene mayor relación superficie/volumen, lo que facilita la interacción con proteínas y organelas celulares, (3) dado que la liberación de los iones se correlaciona directamente con el área superficial y composición de los medios celulares, la tasa de liberación es mayor [37], [39], [40], [41]. Por otro lado, su forma también tendrá una gran influencia respecto a los daños que generarán las AgNP a las células. Stoeher et al. [46] compararon los efectos tóxicos de carácter inmune en células alveolares epiteliales humanas expuestas a nanocables, nanopartículas esféricas y micropartículas (<45  $\mu\text{m}$ ). Los resultados demostraron que los nanocables fueron los más tóxicos al inhibir la viabilidad celular y aumentar la liberación

de colesterol, además de causar un aumento en el calcio intracelular, entre otros efectos de carácter inmunológico. Esto puede relacionarse con la interacción directa entre nanocables de plata con las membranas celulares, en lugar de ser internalizados por endocitosis. George et al. [47] observaron que las AgNP en forma de placa eran más citotóxicas para las células epiteliales de branquias y embriones de pez cebra, en comparación con las AgNP esféricas o en forma de alambre. Los autores lo relacionaron con el alto nivel de defectos de cristal (fallas de apilamiento y defectos puntuales) en la superficie de la nanoplaca.

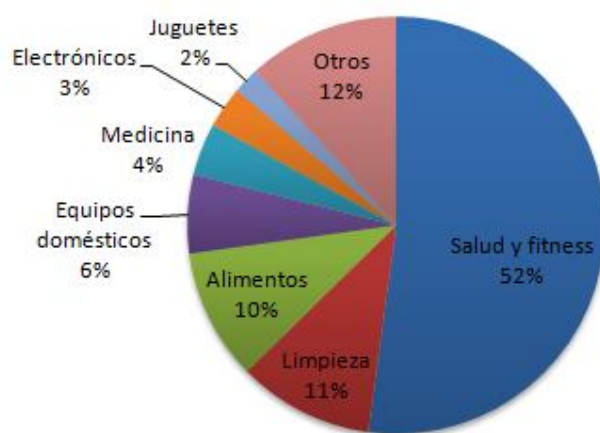
### 3.2.2 Aplicaciones

Las AgNP son conocidas como “el líder” en contra la actividad microbiana de patógenos [8]. Como se mencionó anteriormente, tienen el área superficial aumentada en comparación con la sal de plata [56], lo que resulta en un mejor contacto con los microorganismos y una capacidad biocida más efectiva [57]. Además de aplicaciones antibacteriales, también se incluyen las antifúngicas, antivirales y anti-inflamatorias [50]. Se utilizan para combatir un gran espectro de bacterias Gram-negativas como *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas* y *Salmonella*; y Gram-positivas como *Bacillus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, incluyendo cepas resistentes a antibióticos [58]. Hay estudios que han demostrado que las AgNP se combinan con antibióticos como la penicilina G y amoxicilina (entre otros), y así generan un efecto sinérgico contra patógenos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* [59]. También han resultado ser una herramienta valiosa para combatir virus al inhibir su replicación [50], inclusive el HIV-1 y el virus gripal [60], [61]. Además, existen reportes que corroboran su rápida acción contra diferentes tipos de hongos como *Candida* [62] y *Aspergillus* [63].

La base de datos Nanotechnology Project of the Woodrow Wilson International Centre for Scholar ([www.nanoproject.org](http://www.nanoproject.org)) detalló un inventario de productos globalmente disponibles que contienen AgNP. Wijnhoven et al. [50] explican en una revisión que desde el año 2006 el inventario de ítems que contienen AgNP ha aumentado un 175% (de 212 a 580 productos) a fines del año 2007, y ya por el año 2008 un aumento del

279% (803 productos) fue registrado respecto al 2006. Los autores destacan la incorporación de estas nanopartículas en la cadena de producción de alimentos dado que su aplicación ocurre en las etapas de: procesamiento de alimento, al ser utilizadas en equipos; en la conservación, como la refrigeración y envasado; e inclusive cuando son consumidos, por ser adicionadas como “suplementos”. En todos los casos la aplicación de las AgNP tiene fines antibacterianos y promueve evitar el crecimiento de patógenos.

Entre su gran espectro de usos, estas NP se incorporan en filtros de agua y aire, cosméticos y desodorantes, pinturas, textiles, equipos eléctricos como lavadoras y refrigeradores, e insumos médicos [51]. La Comisión Europea [15] describió las aplicaciones de las AgNP según grandes volúmenes: productos antibacteriales para la curación de heridas, instrumental médico, telas anti-microbianas, purificación de agua y tintas y films conductores; y según bajos volúmenes de producción: uso en envasado de alimentos; y como implementación novedosa: vidrios/plásticos inteligentes (*smart glasses*) [65]. La Figura 3 grafica los usos más comunes de las AgNP según los diferentes campos de aplicación. El mayor porcentaje corresponde al área de salud y “fitness” (52.61%), y en menor proporción (~10%) para productos de limpieza y alimentos.



**Figura 3.** Categorías de productos que contienen AgNP (modificado de Pulit-Prociak & Banach, [8])

### 3.2.3 Liberación al ambiente acuático

#### 3.2.3.1 Fuentes de liberación y concentraciones estimativas

La liberación de las AgNP puede ocurrir en cualquier etapa del ciclo de vida del producto: producción, transporte, almacenamiento, uso y deposición [66]. Las AgNP entran a los ambientes de forma aérea, a través de efluentes, vertidos y escurrimiento. Las concentraciones predichas en ambientes acuáticos son de escala  $\mu\text{g L}^{-1}$  o  $\text{ng L}^{-1}$  [67]. La concentración total de Ag registrada en el ambiente acuático fue de  $8.9 \mu\text{g L}^{-1}$  (en Galvestonbay, Texas) [68]. En el río Colorado (Estados Unidos) se detectó la mayor concentración de Ag por parte de la EPA (Environmental Protection Agency) [69] establecida como  $38 \mu\text{g L}^{-1}$ . En cuanto a ambientes oceánicos, el valor fijado de AgNP para los ambientes marinos por la USEPA (United States Environmental Protection Agency) es  $2.3 \mu\text{g L}^{-1}$ . La concentración de Ag para mar abierto fue estimada como  $0.03\text{-}0.1 \text{ ng L}^{-1}$ , aunque en regiones costeras aumentó hasta  $0.14\text{-}1.29 \text{ ng L}^{-1}$  [70], [71].

Kaegi et al. [72] reportaron que las pinturas para exterior que contienen AgNP liberaron un 30% del contenido de las nanopartículas en el transcurso de un año, mientras que de dicho porcentaje un 80% se perdió en los primeros dos meses. Las AgNP se encontraban en una solución coloidal y se unieron a ligandos orgánicos, por lo que la principal formación sería  $\text{Ag}_2\text{S}$  (un conjugado menos tóxico).

Por su parte, Farkas et al. [73] midieron la cantidad de AgNP liberadas en el agua residual de máquinas lavadoras, y hallaron una concentración promedio de  $11 \mu\text{g L}^{-1}$ . El efluente resultante mostró efectos negativos en las comunidades bacterianas naturales por una disminución en su abundancia cuando fueron expuestas al mismo. Por lo tanto, los autores resaltan la amenaza a los ambientes a través de una tarea doméstica sencilla y rutinaria como el lavado. Benn & Wasterhoff [74] estudiaron la liberación de AgNP en calcetines y determinaron que la plata total era de hasta  $68 \mu\text{g g}^{-1}$  de tela durante un único lavado. Una liberación mucho mayor, de  $377 \mu\text{g g}^{-1}$  de tela, fue descrita por Geranio et al. [75] a partir del lavado de diferentes tipos de textiles, mientras que al

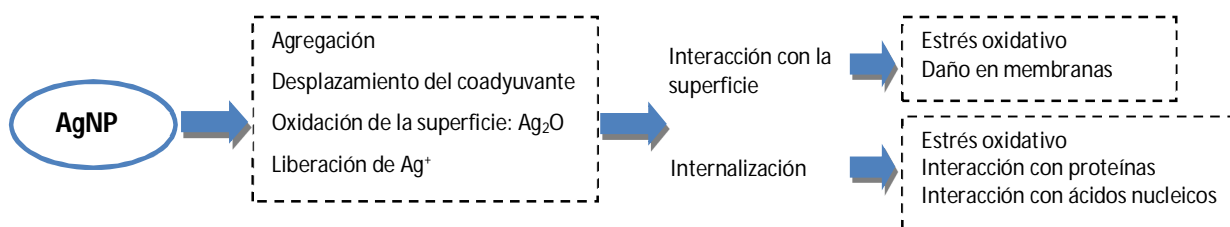
menos un 50% de la Ag en la mezcla de la máquina se hallaba en forma de partículas de más de 450 nm.

Los productos de cuidado personal como jabones, champús y pasta dentífrica contienen  $<10 \mu\text{g Ag g}$  por producto, mientras que la indumentaria contiene aproximadamente 30-45  $\mu\text{g Ag g}$  por producto. Las máscaras para rostro e indumentaria para el sector médico contienen los mayores niveles de Ag (270.000 y 230.000  $\mu\text{g Ag g}$  por producto, respectivamente) [74]. También se comprobó el potencial de migración de las AgNP desde recipientes plásticos al alimento que contienen [77]. La AgNP total de los recipientes plásticos fue de 13 a 42  $\mu\text{g g}^{-1}$ , con una tasa máxima observada de 3.1  $\text{ng cm}^{-2}$  luego de 10 días. Sin embargo, desafortunadamente, no existen estimaciones precisas sobre la emisión de estas nanopartículas, dado que los productos que las contienen no aclaran esta información, ni sobre el contenido o la forma que poseen las AgNP [75].

### 3.2.3.2 Destino en el ambiente acuático

La disolución del ion  $\text{Ag}^+$  es el factor más reportado que determina los efectos tóxicos generados por las AgNP. Cuando las nanopartículas metálicas alcanzan los ambientes acuáticos, liberan este ion que es uno de los más tóxicos para los organismos que habitan en ellos [78]. Las AgNP poseen un mecanismo de acción llamado “caballo de Troya” dado que, si bien en los medios de dispersión pueden ser más o menos estables (dependiendo del tipo de coating), una vez que se internalizan en las células liberan el ion  $\text{Ag}^+$  [79]. La disolución de las AgNP es particularmente relevante para los peces, dado que está bien documentado la habilidad por parte del ion en alterar la osmorregulación a través de la inhibición de la enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ . Sin embargo, si bien la toxicidad de estas NP está íntimamente relacionada con dicho ion, aún no se ha comprendido en qué proporción los efectos tóxicos se explican por sus propiedades intrínsecas o por sus propiedades iónicas [80]. Debido a su pequeño tamaño, la cinética de las AgNP sería más veloz que la del nitrato de plata, lo que reduce el tiempo de vida del estado metálico de Ag en la naturaleza [81].

La Figura 4 muestra un resumen de los fenómenos que pueden ocurrirle a las AgNP en el medio ambiente según McShan et al. [80]. Al igual que la mayoría de las NP, uno de los principales factores que determinará su destino es la pérdida y desplazamiento del agente coadyuvante. Aquellos compuestos por sustancias como ácido cítrico, aminoácidos, entre otros, están covalentemente unidos a las NP. La dispersión de AgNP en un medio biológico o ambiental causará que este capping restablezca su equilibrio, mayormente a través de la pérdida de sus moléculas. Algunas serán desplazadas por otras moléculas disponibles en el medio, o también podría ocurrir que una parte de las AgNP no tendrán capping por la falta de sustancias presentes que lo puedan reemplazar. Como resultado, la AgNP serán inestables en este medio. Otro factor importante que determina el destino de estas NP, es la agregación y/o la aglomeración. Debido al desplazamiento del capping provocado por otras moléculas como el agua o iones inorgánicos, la nanopartícula no se encontraría estable por sí misma y entrará en un estado de agregación. Por último, otra reacción posible es la oxidación de la superficie de la nanopartícula y la consecuente liberación del ion  $\text{Ag}^+$ . La oxidación puede ocurrir en el medio ambiente y en fluidos biológicos, como también dentro de las células, por lo tanto, las AgNP son capaces de liberar estos iones inclusive si se aglomeran.



**Figura 4.** Destino y toxicidad de AgNP en medios biológicos y ambiente (modificado de McShan et al., [80])



Muchos estudios han remarcado que la transformación de las AgNP en el medio ambiente está fuertemente influenciada por la concentración de iones sulfuros ( $S^{2-}$  y  $SH^-$ ) y compuestos con coating de sulfuros, oxígeno disuelto,  $Cl^-$ , macromoléculas biológicas (ADN y proteínas), entre otros compuestos orgánicos que poseen fuerte afinidad tanto por la plata atómica como por la iónica. Los ligandos sulfuros son los más efectivos en reducir la toxicidad de las AgNP dado que forman compuestos  $Ag_xS_y$  [82]. La cinética de reacción de las AgNP y sus mecanismos dependen del oxígeno disuelto, pH, condiciones de luz, presencia de materia orgánica, así como la alta o baja de concentración sulfuros. Por ejemplo, se sabe que las más pequeñas (5.5 nm aproximadamente) son menos estables y 50 veces más solubles en agua que las más grandes (76.6 nm) [83].

En los últimos años, la investigación sobre la agregación y transformaciones químicas de las AgNP se ha convertido en un “hotspot” para predecir su destino en el ambiente [84]. Sin embargo, son escasos los estudios que tienen en cuenta la potencial disminución de la toxicidad de las AgNP cuando reaccionan con estas sustancias presentes en los cuerpos de agua naturales. Dos factores claves para que ocurra la agregación de las AgNP en ambientes acuáticos son la presencia de electrolitos (especialmente  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ ) y de materia orgánica disuelta, y adicionalmente la luz solar podría acelerar cambios en su morfología, agregación y sedimentación [85]. Además, la materia orgánica podría contribuir a la unión de las AgNP con las adyacentes y formar “nanoestructuras”. Esta “fusión” o agregación, a su vez, provocaría la sedimentación de las AgNP. Por lo tanto, sería razonable que la agregación también disminuya la movilidad de las AgNP en matrices como sedimento y suelos arenosos [84].

Las sustancias húmicas conforman la mayor parte de la materia orgánica en los sistemas acuáticos, que a su vez contienen ácidos húmicos (AH). Estos últimos tienen influencia en la biodisponibilidad y toxicidad de compuestos orgánicos en los sistemas acuáticos, y también el destino de las NP se ve condicionado en gran medida por la interacción con estas sustancias orgánicas naturales [86], [87].

La agregación de las AgNP podría disminuir su toxicidad al quedar menos biodisponibles en la columna de agua, como fue demostrado en un ensayo con bacterias [88]. Gao et

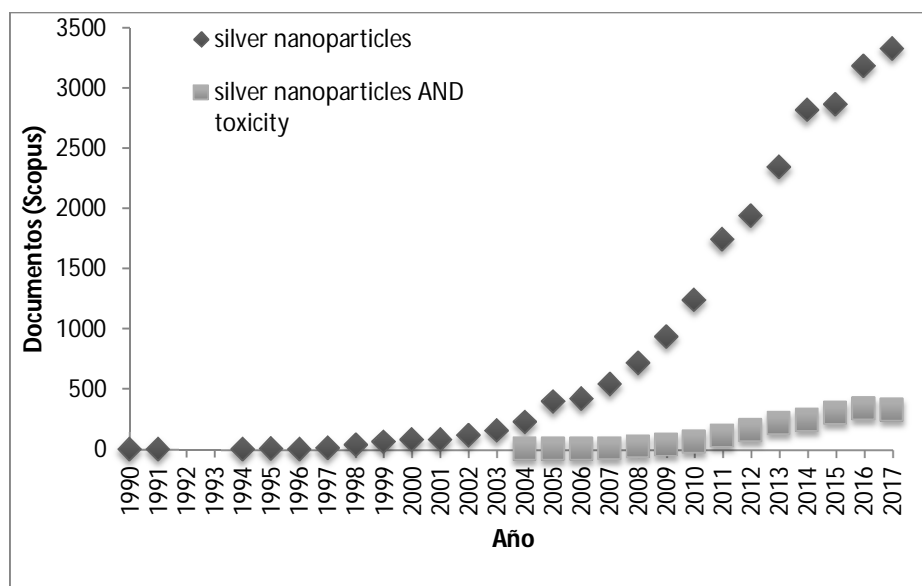
al. [89] demostraron que la presencia de materia orgánica natural (NOM), más precisamente AH, era capaz de reducir la toxicidad de las AgNP significativamente por mecanismos de adsorción a su superficie. Bajas concentraciones de AH fueron capaces de estabilizar las suspensiones con AgNP e indujeron a la agregación y deposición de las mismas. Concretamente, un ensayo con *Ceriodaphia dubia* expuestas a concentraciones crecientes de AH, demostró una clara relación entre el aumento de la concentración de AH y la disminución en la tasa de mortalidad [90]. Un estudio con *Oncorhynchus mykiss* expuestos a AgNP y AH, comprobó la disminución de los efectos tóxicos por parte de las nanopartículas metálicas, tanto en su estadio como alevines como juveniles, debido a que se aglomeraron [91].

Los cambios en las condiciones fisicoquímicas de los medios a donde llegan las AgNP (por ejemplo, temperatura, salinidad y oxígeno disuelto) pueden afectar el estado de agregación de las partículas. Sustancias exopoliméricas (SE) excretadas por fitoplancton y bacterias inducen la agregación de las AgNP, y pueden exacerbar o reducir su toxicidad. Por ejemplo, las SE proveen ligandos para los tóxicos (como los iones de metales traza) que influyen indirectamente sobre los efectos potenciales. Las AgNP presentan una gran tendencia a agregarse parcialmente, pero ante grandes concentraciones de NaCl y en presencia de cationes divalentes, las nanopartículas pierden su estabilización electrostática coloidal. En aguas dulces, la disolución de las AgNP produce iones  $\text{Ag}^+$ , pero cuando aumentan los niveles de salinidad, los complejos  $\text{AgCl}$  son los más prevalentes [23]. Tanto en agua de mar como de ambientes de estuarios, la concentración de los complejos cloro-Ag es mucho mayor que en agua dulce, los cuales son altamente biodisponibles. Consecuentemente, los organismos acuáticos marinos son más susceptibles a bioacumular Ag [92].

### 3.2.4 Efectos tóxicos en los organismos acuáticos

Como consecuencia de la producción creciente de AgNP, aumenta la carga de Ag en los ambientes, así como los impactos sobre la biota [74]. Existe una gran preocupación al respecto dada la creciente evidencia de efectos tóxicos de las AgNP en los organismos acuáticos [93]. En este contexto, “The International Center of Technology Assessment”

autorizó la petición a la USEPA a tomar control sobre todos los productos de consumo que contengan AgNP para evaluar el riesgo que conlleva su uso en el mercado comercial [76]. A pesar de dicha preocupación, si se compara la información publicada sobre las AgNP con aquella relacionada con estudios sobre su toxicidad, es evidente un retraso en el tiempo y en la cantidad de documentos desarrollados (Figura 5).



**Figura 5.** Número de búsquedas en Scopus (www.scopus.com) en junio de 2018 utilizando las palabras “silver nanoparticles” y “silver nanoparticles AND toxicity” (“AND” significa la combinación de las dos palabras).

Es importante remarcar que la mayoría de estos trabajos que abordan los efectos tóxicos de las AgNP (al igual que otras NP) comprenden estudios celulares *in vitro*. No obstante, para obtener una evaluación más completa y real, es necesario comprender los mecanismos de toxicidad generados en diferentes organismos. El riesgo que conllevan las AgNP debe ser cuidadosamente evaluado sobre los diferentes componentes del ambiente, haciendo énfasis en los ecosistemas acuáticos por ser los sumideros finales de muchos xenobióticos [17], [52].

A continuación, se detallan los principales efectos tóxicos de las AgNP, con énfasis en organismos acuáticos.

#### 3.2.4.1 Entrada y acumulación

La plata puede ingresar a los organismos través de varias vías como la ingestión, inhalación e inclusive por contacto con la piel. Los iones  $\text{Ag}^+$  pueden atravesar el tracto intestinal y respiratorio a través de las membranas mucosas [94]. En las superficies externas de los organismos acuáticos, las AgNP son capaces de incrustarse mediante fuerzas peri-cinéticas, atraerse electroestáticamente, y por último unirse a las mucoproteínas. Aquellas superficies (como las branquias y el intestino de los peces) generalmente están cubiertas por una capa mucosa protectora donde se desarrolla un biofilm con funciones de defensa inmunológica contra patógenos, parásitos o sustancias tóxicas [95]. Un tipo de respuesta por parte de los peces a xenobióticos es la producción excesiva de este mucus (especialmente en el epitelio branquial), seguido por un cambio en el número de células secretoras de mucus [96]. Se ha demostrado una hipersecreción de mucus en los peces como respuesta a la exposición a metales [97], y AgNP [98], [99], [100], [101]. Asimismo, se ha comprobado un efecto biocida de las AgNP sobre las colonias bacterianas que viven sobre la superficie de peces y oligoquetos [101], [102].

Una vez internalizadas, las AgNP pueden ser fácilmente absorbidas por las células debido a sus propiedades fisicoquímicas, lo que les permite interactuar con macromoléculas biológicas y ser transportadas a través del cuerpo de un organismo. Las AgNP además se unen a diferentes proteínas e ingresan por el mecanismo de fagocitosis [94] y también por endocitosis [103], según el mayor o menor tamaño respectivamente.

La acumulación de Ag en órganos internos (hígado, cerebro, intestino) y externos (branquias) de peces expuestos a AgNP está ampliamente reportada [101], [104], [105], [106]. Si bien existe controversia acerca de cuál es la principal ruta de entrada, gran parte de la evidencia sostiene que la vía gastrointestinal en los peces es la más importante y el principal sitio de acumulación es el hígado [104], [105]. Por otro lado, las AgNP también pueden quedar retenidas en la superficie de los organismos donde causan otro tipo de daños [107].

Se han reportado altos niveles de Ag en el tejido blando de moluscos expuestos a estas nanopartículas [68], [108], [109], [110]. Una vez que las AgNP son absorbidas por parte

de las células de los moluscos, interacciona el ión  $\text{Ag}^+$  con la bicapa fosfolipídica lo que causa desestabilización de sus membranas lisosomales [92], [111].

### 3.2.4.2 Estrés oxidativo

El principal efecto tóxico causado por las AgNP es el estrés oxidativo. Al igual que todos los compuestos que contengan Ag, las AgNP tienen la característica de poseer gran afinidad por los sulfuros que están presentes en las macromoléculas como proteínas [80], y al interactuar con ellas dañan su estructura.

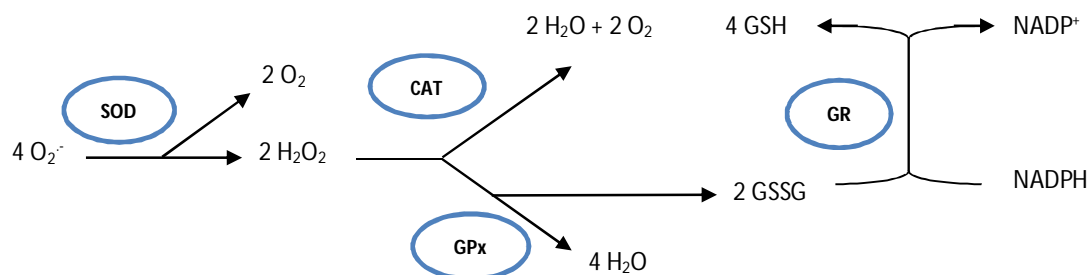
La causa más importante de la toxicidad del oxígeno es su propensión a la transferencia de electrones que genera intermediarios reactivos o especies reactivas de oxígeno (ROS). El oxígeno tiene la habilidad de aceptar electrones en el transporte electrónico mitocondrial, lo que lleva a la producción de adenosin trifosfato (ATP) de alta energía (mecanismo clave para organismos anaeróbicos) [112]. Aproximadamente un 0.1-0.4% del oxígeno se convierte en anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) [52]. En este proceso, se reduce a agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ), y durante la cadena de reacciones se producen las ROS:  $\text{O}_2^-$ , radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) (radicales libres) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Un radical libre es cualquier especie capaz de existir independientemente que contiene uno o más electrones desapareados [113]. Aunque el  $\text{H}_2\text{O}_2$  no es un radical libre, es un agente reductor y oxidante débil. Su naturaleza neutra le permite penetrar en las membranas celulares, aunque su mayor importancia en el estrés oxidativo se relaciona por la capacidad de servir como precursor  $\cdot\text{OH}$  [113].

Un antioxidante se denomina a una sustancia que retrasa, previene o remueve daños oxidativos en una molécula blanco [113]. En organismos sanos, la producción de ROS está relativamente balanceada por la actuación del sistema de defensa antioxidante (SDA). Esta defensa celular está compuesta por (1) compuestos antioxidantes (como el glutatión y las vitaminas C y E) y enzimas antioxidantes; (2) un sistema de reparación directa, que puede reparar aminoácidos y proteínas dañadas y el ADN; y (3) un sistema de reparación indirecto que remueve y reemplaza los componentes dañados [114]. En

consecuencia, si ocurre un desbalance entre la generación/remoción de ROS, el SDA resulta dañado [52].

Un exceso de sustancias antioxidantes para evitar daños tiene un costo energético alto, y en ocasiones conlleva menos energía reemplazar o reparar las biomoléculas dañadas. Respecto las enzimas antioxidantes, la glutatión S-transferasa (GST) tiene un rol crítico en el SDA [115]. La reacción más importante catalizada por todas las isoformas de esta enzima es la conjugación del glutatión (GSH, tripéptido de cisteína, glutamato y glicina). La GST puede catalizar la reducción de peróxidos celulares a sus correspondientes alcoholes y conjugar aldehídos insaturados genotóxicos endógenos formados durante la peroxidación de lípidos de membrana (LPO) [116].

Otras enzimas claves para la detoxificación de ROS son la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT), en conjugación con enzimas que proveen equivalentes reductores como la glutatión reductasa (GR) (Figura 6). El GSH juega un rol central en el proceso de detoxificación: actúa como antioxidante o como cofactor de la actividad de GPx. La coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su estado reducido (NADPH) debe ser oxidada ( $\text{NADPH}^+$ ) para mantener los niveles de GSH a través de la actividad de la GR. Entonces, la GPx remueve el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de la conversión de GSH (reducido) en su estado reducido al oxidado (GSSG), y la GR mantiene los niveles de GSH a través de la oxidación de NADPH. Por su parte, la CAT también cataliza la descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  [113].



**Figura 6.** Componentes enzimáticos y principales reacciones del sistema de defensa antioxidante (modificado de Halliwell & Gutteridge [113])

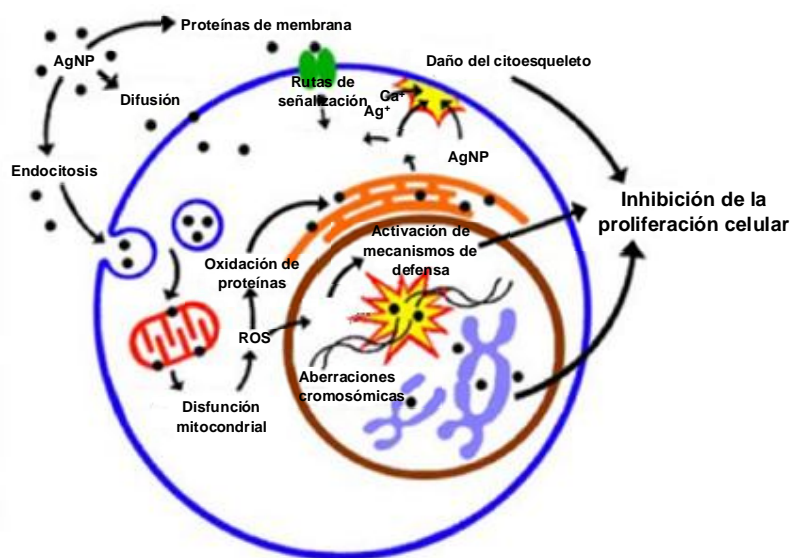
Sin embargo, la disminución o activación de sustancias o enzimas antioxidantes, y el incremento en la producción intracelular de ROS son las causas principales del estrés oxidativo. Uno de los blancos de las ROS son los ácidos grasos poli-insaturados (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA), característicos por contener dos o más uniones dobles entre los carbonos. Los PUFA asociados a las membranas celulares son de particular interés, incluyendo las mitocondrias, lisosomas y retículo endoplasmático. En los PUFA, los átomos de hidrógeno asociados a carbonos saturados (hidrógenos alifáticos) adyacentes a carbonos participantes de esas uniones dobles son susceptibles a ser sustraídos por las ROS. Esta sustracción representa la iniciación a la peroxidación lipídica (LPO), por lo que la susceptibilidad de los PUFA se incrementa con el número de uniones dobles insaturadas [112]. El efecto más importante de la LPO es la disminución de la fluidez y permeabilidad de la membrana celular, lo cual facilita el intercambio de fosfolípidos entre la bicapa lipídica e incrementa la fuga de ciertas sustancias que no podrían cruzar la membrana sin ayuda de canales de transportadores especializados (como el  $\text{Ca}^{2+}$ ). También tiene efectos directos sobre las proteínas constituyentes de las membranas provocando su daño, inactivando enzimas y canales iónicos, y/o disminuyendo su movilidad lateral rotacional [113].

La habilidad de los NM en generar ROS radica en sus reacciones únicas de catálisis redox que se generan en la superficie; esto resulta especialmente relevante cuando las partículas son de tamaño menor a  $<30$  nm, dado que poseen una gran área respecto al volumen [117]. Desde una perspectiva química las AgNP pueden generar ROS de dos formas: (1) la Ag cero-valente tiene un potencial relativo bajo que puede participar en reacciones de Fenton que involucran al  $\text{H}_2\text{O}_2$  a pH ácido, lo que genera la formación del radical hidroxilo  $\cdot\text{OH}$  y la disolución de las AgNP. (2) Las AgNP pueden formar ROS cuando los electrones oscilan a la misma frecuencia que la luz incidente de los fotones, resultando en una superficie de resonancia de plasmón y dando lugar a la formación del radical superóxido  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , que a su vez es capaz de convertirse en otras ROS [118]. Desde un punto de vista biológico, es más probable que ocurra la segunda opción, dado que el pH en los ambientes naturales comúnmente oscila de 7 a 8 [52].

Alteraciones en el sistema enzimático de defensa antioxidante, agotamiento de sustancias antioxidantes y daño oxidativo han sido ampliamente reportados, tanto en

peces [105], [119], [121], [122], [123] como en moluscos [110] [124], [125] expuestos a AgNP.

A modo de resumen, AshaRani et al. [103] propusieron un esquema de los principales mecanismos de toxicidad por parte de las AgNP cuando interaccionan con la célula (Figura 7). Las AgNP ingresan a la célula por pinocitosis o endocitosis y allí generan ROS, causan disfunción en las mitocondrias, dañan proteínas y ácidos nucleicos, y por último inhiben la proliferación celular. Particularmente, las mitocondrias son organelas sensibles, dado que las AgNP son capaces de acumularse por fuera de ellas y causar daño directo obstaculizando su función en la cadena respiratoria, lo que también generan ROS (y estrés oxidativo), e interrupción de la síntesis de ATP [126]. A su vez, las AgNP dañan las membranas celulares afectando su permeabilidad y la estructura de las macromoléculas. Por último, las AgNP son capaces de unirse al ADN y también generar cambios en su conformación, por lo que se las consideran como un inductor de genotoxicidad [80].



**Figura 7.** Mecanismo de toxicidad de las AgNP (modificado de AshaRani et al., [103])



### 3.2.4.3 Genotoxicidad

En relación al punto anterior, el ADN es otro componente celular clave susceptible al daño oxidativo. De hecho, el principal efecto genotóxico reportado por parte de las NP se debe a la producción de ROS [52].

La internalización y acumulación de las NP dentro de la célula promueve la interacción directa con el ADN dentro del núcleo o con los constituyentes celulares asociados (nucleosomas, microtúbulos, filamentos de actina, centrosomas). Las NP pueden ingresar a través de la membrana por complejos transportadores nucleares de poros, o ser atrapadas por el núcleo mientras ocurre la mitosis. Una vez que ingresan, ejercen diferentes interferencias químicas en todo el material genético, además de alterar o inhibir la replicación, transcripción y proliferación celular [127], [128], [129]. Por su parte, los iones  $\text{Ag}^+$  se unen covalentemente con el ADN y pueden inhibir su replicación y la división celular [130], [132].

Las NP o los iones intracelulares liberados por ellas, pueden generar la liberación de DNAsas al citoplasma y permitir su pasaje al núcleo celular y generar cortes en el ADN [131]. La exposición de células a AgNP ha generado alteración de genes de reparación (dando lugar a daños), aumento de peroxidación lipídica y estimulación de factores de apoptosis [53]. Existe evidencia que sustenta el daño genotóxico por parte de las AgNP en organismos como la proliferación de micronúcleos, alteración de funciones mitocondriales, estrés oxidativo y cambios en el ciclo celular [123], [132], como así también la inducción de genes asociados a la reparación del ADN [133]. También hay evidencia de daños en el ADN en hemocitos de moluscos [109], [125] y eritrocitos de peces [93], [101], [106], [134] a partir del ensayo cometa. Kawata et al. [133] sugieren que se debería revisar lo constatado por la USEPA al no considerar a la plata como un elemento potencial cancerígeno para los humanos. A pesar que la noción del estrés oxidativo generado por las AgNP está respaldada por numerosas investigaciones, aún quedan grandes vacíos por llenar en cuanto a la dinámica de las AgNP y las ROS a nivel celular.

#### 3.2.4.4 Metalotioneínas

La inducción de las metalotioneínas (MT) es otro biomarcador de gran relevancia y muy reportado como mecanismo celular de defensa ante radicales libres. Se tratan de proteínas no enzimáticas de bajo peso molecular, ricas en cisteína y conocidas por poseer grupos tiol (-SH) capaces de unirse a metales pesados [135].

Las MT protegen las células de compuestos oxidantes y electrofílicos, los cuales reaccionan con los grupos sulfhidrilos. Pueden activarse ante una gran variedad de estímulos, incluyendo iones metálicos, citoquinas y factores de crecimiento [136]. Particularmente, son conocidas por formar parte de reacciones metabólicas “de rutina” de metales esenciales, así como de detoxificación en caso de cantidades excesivas de metales esenciales y no esenciales. Sin embargo, sus funciones biológicas aún son un tema en discusión [135].

Debido a su capacidad de unirse a los metales, las MT se consideran claves en el control de la homeostasis de metales esenciales (cobre, zinc), por actuar como sitios de almacenamiento en donde el metal está listo para ser parte de una reacción enzimática en caso de una demanda metabólica. Sin embargo, los metales no esenciales son capaces de desplazar a los esenciales asociados con las MT. Entonces, su inducción puede deberse a metales esenciales como no esenciales (en invertebrados y vertebrados), pero varía intra e interespecíficamente según factores ambientales y fisiológicos propios del organismo en cuestión [135]. Entre sus funciones, las más destacables serían: (1) homeostasis de metales traza esenciales (zinc y cobre), (2) detoxificación de metales no esenciales (cadmio y mercurio), (3) protección contra el daño oxidativo, (4) remoción de radicales libres, (5) actuar como proteína multifuncional [137]. La transcripción de las MT está regulada en respuesta a diferentes tipos de estímulos, particularmente metales pesados, estrés oxidativo y glucocorticoides [137].

Se ha demostrado que la síntesis de MT aumentó varias veces en caso de estrés oxidativo para proteger a la célula de efectos tóxicos y remediar daños al ADN [136]. En muchas especies de moluscos, anélidos, crustáceos, entre otros, la inducción de MT ante

la exposición a contaminantes (plata, cadmio, cobre, mercurio) se ha reportado ampliamente, lo que sugiere su uso como biomarcador en caso de exposiciones a metales [137]. En vertebrados, con énfasis en peces, la detoxificación de los metales traza es un proceso que depende principalmente de la unión con las MT [135]. Existen registros de la inducción de las mismas en proporción a la acumulación de Ag en moluscos expuestos a AgNP [110], [111].

#### 3.2.4.5 Otros efectos tóxicos

Numerosas investigaciones han demostrado la alteración de una amplia gama de biomarcadores en peces y moluscos expuestos a AgNP. Se han registrado cambios en parámetros morfométricos en peces, como en el índice hepatosomático (que refleja daños a nivel hepático) [138], [139]. También la exposición a las partículas metálicas provocó un desbalance en los valores normales de los análisis de sangre de dicho animal, como lo es un estado de anemia aguda [140] o aumento de glóbulos blancos como mecanismo de defensa contra infecciones y procesos inflamatorios [141].

Por otro lado, también se han registrado alteraciones de metabolitos plasmáticos y en las reservas energéticas, como una producción elevada de glucosa en el plasma y de glucógeno en tejido de peces [142], [143], [144]. Esto resulta importante dado que revela un aumento de fuentes de energía disponibles para que el pez utilice en situaciones de estrés [145].

Por su parte, en la hemolinfa de los moluscos se ha corroborado desestabilización de la membrana ante la exposición a las AgNP [125], [146], lo cual revela daños en los lisosomas que son el principal sitio donde ocurre el secuestro de tóxicos y mecanismos de detoxificación [147]. También en moluscos se ha reportado la alteración de la actividad de transporte de resistencia multixenobiótica mediada por los transportadores ABC. Esto es un factor importante respecto a procesos de detoxificación de Ag, dado que reduce la acumulación intracelular y toxicidad por parte de este elemento [125]. Otros tipos de alteraciones se han evaluado en moluscos expuestos a AgNP como

cambios en el comportamiento de alimentación [68] y alteraciones en la micromorfología de la valva [148].

En cuanto a un mayor nivel de daños, las AgNP causaron histopatologías graves en órganos que comprometen su estructura y función como branquias e hígado [119] [149], inclusive la proliferación de células mucosas en piel, branquias e intestino como mecanismo de protección [120].

Por otra parte, también las AgNP se han descrito como “endocrine disruptor” por parte del “World Health Organization’s International Program on Chemical Safety”, es decir una sustancia exógena que altera la(s) función(es) del sistema endócrino y consecuentemente causa efectos deletéreos en un organismo, su progenie o a nivel (sub)población [150]. Las AgNP son capaces de alterar las cascadas de señalización de receptores hormonales o no hormonales, la secreción de hormonas y los mecanismos de retroalimentación o moduladores [52] [151]. Diferentes investigaciones con peces han reportado daños en el sentido del olfato [152], inducción de estrógeno en individuos masculinos [153], reducción de enzimas como acetilcolinesterasa, así como aumentos en los niveles de glucosa plasmática y cortisol [154].

Por último, la exposición a AgNP ha sido relacionada con malformaciones de embriones de moluscos [111] y peces [121]. Se ha comprobado que son capaces de ser absorbidas y transportadas en embriones de peces al penetrar el corion por canales de poros, con cinéticas de absorción de difusión (en vez de transporte activo) [16].

Los efectos de las AgNP han sido mayormente reportados en concentraciones altas, en el orden de  $\text{mg L}^{-1}$  y en condiciones agudas de exposición, mientras que en los escenarios reales ocurre la situación inversa. Por lo tanto, son necesarios más estudios que consideren organismos expuestos a concentraciones bajas y ambientalmente relevantes de AgNP y tiempos crónicos para obtener una interpretación más realista de los riesgos a los que están sometidos efectivamente los ambientes acuáticos y sus componentes.

### 3.2.5 Organismos test y biomarcadores

En el presente trabajo de tesis se propusieron como organismos test peces de hábitos dulceacuícolas y moluscos marinos. La importancia de utilizar los organismos acuáticos para comprender los mecanismos de toxicidad de contaminantes emergentes como las NP, radica en que cualquier alteración en las condiciones naturales del medio causa ajustes fisiológicos; consecuentemente, tales cambios sirven como biomarcadores de contaminación ambiental [155], [156], [157], [158]. Un “biomarcador” puede definirse como una variable bioquímica, fisiológica o anatómica determinable en un organismo, cuya detección y/o magnitud indica la presencia de uno o varios contaminantes [159]. Una situación de estrés causada por la exposición a una sustancia tóxica desencadena una cascada de respuestas biológicas, donde cada una sirve como biomarcador. Cuando estas respuestas son activadas, el potencial de supervivencia de los organismos puede disminuir, dado que se reduce su capacidad de llevar a cabo mecanismos compensatorios a nuevos cambios ambientales [160]. De esta forma, los biomarcadores pueden usarse de una forma predictiva permitiendo la iniciación de estrategias de remediación antes de que ocurran daños ambientales con consecuencias ecológicas irreversibles [115].

Los peces como organismos test han sido ampliamente utilizados y reportados para evaluar impactos de contaminantes [115]. Al estar íntimamente ligados a su hábitat, entran en contacto con los contaminantes de forma directa con el agua o el sedimento, y por ingestión de otros organismos contaminados. Una sustancia se considera tóxica dependiendo de la concentración en el ambiente, de cómo el pez la puede absorber y de cómo se distribuirá en el organismo. Existe una amplia evidencia que afirma que los peces son buenos organismos para evaluar efectos tóxicos generados por AgNP [101], [105], [106], [119], [120], [155] [255].

Por otra parte, los moluscos se consideran organismos blanco al ser bentónicos, dado que las NP generalmente se aglomeran y depositan en la superficie de los sedimentos [68]. Se alimentan de partículas en suspensión, y pueden filtrar grandes volúmenes de agua y procesar microalgas, bacterias, sedimentos y NP (naturales o artificiales) [7], [161]. El género *Mytilus* sp., abundante en las costas marinas y estuarios, representa un

---

modelo pertinente para caracterizar los potenciales impactos por parte de las NP [161]. Particularmente, en el agua de mar, la especiación de Ag es sumamente importante dado que domina la formación del complejo cloro, y su biodisponibilidad y consecuente acumulación en estos organismos es elevada [18].

Teniendo en cuenta estos conceptos y los antecedentes existentes sobre los efectos de AgNP (sección 3.2.3) sobre los organismos acuáticos, en esta tesis se propuso un enfoque multibiomarcador a fin de comprender la entrada, acumulación y efectos sobre diferentes componentes de estos organismos. Además, se desarrollaron diferentes diseños experimentales: ensayos *in vivo* y *ex vivo*, con diferentes tiempos de exposición (corto, subcrónico) y utilizando diversos medios de exposición (agua dulce, marina y solución salina), a partir de los cuales se obtuvo un conjunto de respuestas que revelaron los mecanismos de toxicidad de las AgNP sobre los organismos test.

## 2. OBJETIVOS

### General

Comprender los mecanismos de toxicidad de nanopartículas de plata (AgNP) en organismos acuáticos.

### Específicos

Se propone evaluar los mecanismos de toxicidad de las AgNP utilizando diferentes modelos biológicos y tres (3) diferentes tipos de ensayos:

**(1)** Ensayos *in vivo* con *Prochilodus lineatus*:

- Evaluar los efectos biocidas de AgNP sobre las comunidades bacterianas que viven en el mucus epidérmico de los peces
- Determinar la acumulación de Ag en diferentes tejidos
- Analizar respuestas hematológicas y metabólicas en peces expuestos a AgNP
- Evaluar en diversos tejidos marcadores de estrés oxidativo
- Registrar y cuantificar alteraciones histológicas en las branquias
- Obtener una visión integradora de los efectos tóxicos a partir del análisis simultáneo de las respuestas biológicas

**(2)** Ensayos *ex vivo* con branquias de *Piaractus mesopotamicus* y *Corydoras paleatus*:

- Evaluar respuestas de marcadores de estrés oxidativo en branquias expuestas *ex vivo* a AgNP y AgNO<sub>3</sub>
- Analizar si los efectos observados en las branquias *ex vivo* son mitigados por la presencia de ácidos húmicos en el medio

**(3)** Ensayo *in vivo* con el bivalvo marino *Mytilus galloprovincialis*:

- Determinar la acumulación de Ag total en el tejido blando del bivalvo expuesto a AgNP
- Analizar la estabilidad de la membrana lisosomal y efectos genotóxicos en la hemolinfa
- Analizar respuestas de marcadores de estrés oxidativo e inducción de metalotioneínas en la glándula digestiva
- Examinar la actividad mediada por los transportadores de membrana en las branquias



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Ensayos *in vivo* con *Prochilodus lineatus*

#### 5.1.1 Caracterización de las AgNP

Los ensayos se realizaron con nanoplata coloidal nanArgen® (solución stock de 10.000 ppm), producida y comercializada por la empresa Nanotek S.A. (Argentina). Su ingrediente principal se informó como plata metálica (n° CAS 7440-22-4). De acuerdo a la Hoja de Seguridad de Materiales, el tamaño promedio de nanopartícula fue de 20-40 nm. El agente coadyuvante o coating estaba hecho de oligómeros de glucosa, principalmente celulosa nanocristalina.

Respecto a la caracterización del stock de AgNP se utilizó microscopía de transmisión electrónica (TEM) para determinar el tamaño y forma de las partículas. Rápidamente, una alícuota de la solución acuosa fue depositada en un filtro recubierto con carbono y cobre de malla 400 (*400-mesh carbon-coated copper grids*). Luego de 1 min, el líquido fue colado con papel de filtro (Whatman n° 4), para llevar a cabo el análisis TEM a temperatura ambiente con un microscopio electrónico JEOL 1011 operando a 100 kV.

Por otro lado, se llevó a cabo un análisis de energía dispersiva (EDS) para la caracterización química de la suspensión de nanoplata particulada. Adicionalmente, una alícuota del stock de AgNP se dejó secar al aire sobre un filtro recubierto con carbono (*carbon film-coated grid*). Luego, se analizó la muestra por microscopía electrónica de barrido (SEM) en un equipo Zeiss EVO 40 (Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany) a 20.000x.

En paralelo, se evaluó la liberación de iones  $\text{Ag}^+$  proveniente del stock de AgNP en el agua de ensayo. Para esto, la suspensión de AgNP fue filtrada en diferentes intervalos de tiempo utilizando equipamiento de ultrafiltración Vivaspin TM (30 kDa MWDO, Startorius Stedim Biotech GmbH), para que el filtrado final sea luego medido con un

espectro de absorción atómica (EAA) VGP 210 (BuckScientific, East Norwalk, CT, USA) por el método de atomización electrotérmica utilizando tubos de grafito pirolítico.

#### 5.1.2 Peces y aclimatación

La especie seleccionada para los ensayos *in vivo* fue *Prochilodus lineatus* (sábalo) (Pisces, Prochilodontidae) (Figura 8). Esta especie neotropical constituye un 60% de la ictiofauna del río Paraná Medio (100 kg/hectárea) [162]. Es de hábitos iliófago-detritívoro [163] por lo que está muy asociada al sustrato en los cuerpos de agua. Numerosas investigaciones han demostrado su sensibilidad a tóxicos y su aclimatación y tolerancia a condiciones de laboratorio [164], [165], [166], [167].



Figura 8. Ejemplar de *Prochilodus lineatus*.

Los ensayos se realizaron con juveniles obtenidos de un criadero de la región (Pez Campero, Paraná, Entre Ríos). Para la aclimatación, los ejemplares se mantuvieron en tanques de 120 L durante dos semanas, con agua declorada y aireación constante, y fueron alimentados *ad libitum* con pellets comerciales. Los parámetros del agua fueron: pH 6.58; conductividad 178 mS cm<sup>-1</sup>, dureza total 48.01 ppm CO<sub>3</sub>Ca, calcio 16.0 ppm Ca<sup>++</sup>, magnesio 2.0 ppm Mg<sup>++</sup>, alcalinidad 60.0 ppm CO<sub>3</sub>Ca, 61.50 CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>. Las condiciones de laboratorio fueron ciclos de 12:12 h luz-oscuridad y temperatura de 25±1 °C. Todos los experimentos se llevaron a cabo según las normas institucionales para la protección de bienestar animal [168].

### 5.1.3 Ensayo preliminar: Determinación de $CL_{50}$

A fin de establecer las concentraciones subletales a testear durante los ensayos definitivos, se llevó cabo un ensayo preliminar para determinar la concentración letal 50, luego de 96 h de exposición ( $CL_{50}$ -96 h). Además, para la selección de las concentraciones a ensayar se tuvieron en cuenta resultados de experiencias previas [169]. Se partió de una concentración que no genera mortalidad en los juveniles de sábalo ( $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$ ), y se aplicó un factor de dilución de 0.6. Se ensayaron cuatro concentraciones de AgNP ( $25.00 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $41.66 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $69.44 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $115.74 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y un grupo en ausencia de AgNP (control). El ensayo fue realizado bajo las mismas condiciones de laboratorio descriptas para el período de aclimatación. Se utilizaron peceras de vidrio de 25 L, que contenían 5 peces por pecera, con dos réplicas por tratamiento. El ensayo fue de tipo estático y los peces no fueron alimentados durante su exposición. Los individuos muertos (sin movimiento opercular) se removieron de las peceras de inmediato. Los porcentajes de mortalidad acumulada fueron registrados cada 24 h. Luego de 96 h, se calculó la  $CL_{50}$  utilizando el software de edición gratuita 1.5 USEPA Probit (United States Environmental Protection Agency) [170].

### 5.1.4 Ensayo definitivo: Diseño experimental

Las concentraciones subletales de AgNP seleccionadas para el ensayo definitivo fueron:  $0 \mu\text{g L}^{-1}$  (control);  $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$  (~5% de la  $CL_{50}$ );  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  (~50% de la  $CL_{50}$ ). Los peces ( $n=120$ ;  $6.81 \pm 0.08$  cm longitud estándar;  $6.58 \pm 0.23$  g) fueron ubicados de a dos ejemplares en peceras de 10 L, y cada tratamiento se replicó 20 veces (Figura 9). Con el fin de disminuir el estrés de los peces en condiciones experimentales, las paredes de los acuarios fueron cubiertas con plástico negro. El ensayo fue semi-estático, con renovación del 100% de los tratamientos (y control) cada 48 h. Los peces fueron alimentados con pellets comerciales *ad libitum* una vez por día por la mañana (aproximadamente 8:00 AM). Luego de 5 y 15 días de exposición, los peces fueron disectados para la toma de muestras de tejidos. Previo a la disección, los animales fueron anestesiados con benzocaína [171], medidos, pesados y se les extrajeron las muestras de sangre a través de un corte en el pedúnculo caudal [172]. En el caso del

ensayo de 15 días, se extrajo una muestra de mucus epidérmico que se inoculó inmediatamente en agar para el posterior conteo de colonias formadoras de bacterias. Luego, se sacrificaron para la extracción del hígado, branquias, intestino, cerebro y músculo. Las determinaciones hematológicas se realizaron en el momento, y los restantes tejidos fueron almacenados a -80 °C hasta su procesamiento. En el caso de las branquias, se conservó el segundo arco branquial (lado derecho) de cada pez en paraformaldehído (PAF) al 4% para las determinaciones histológicas.

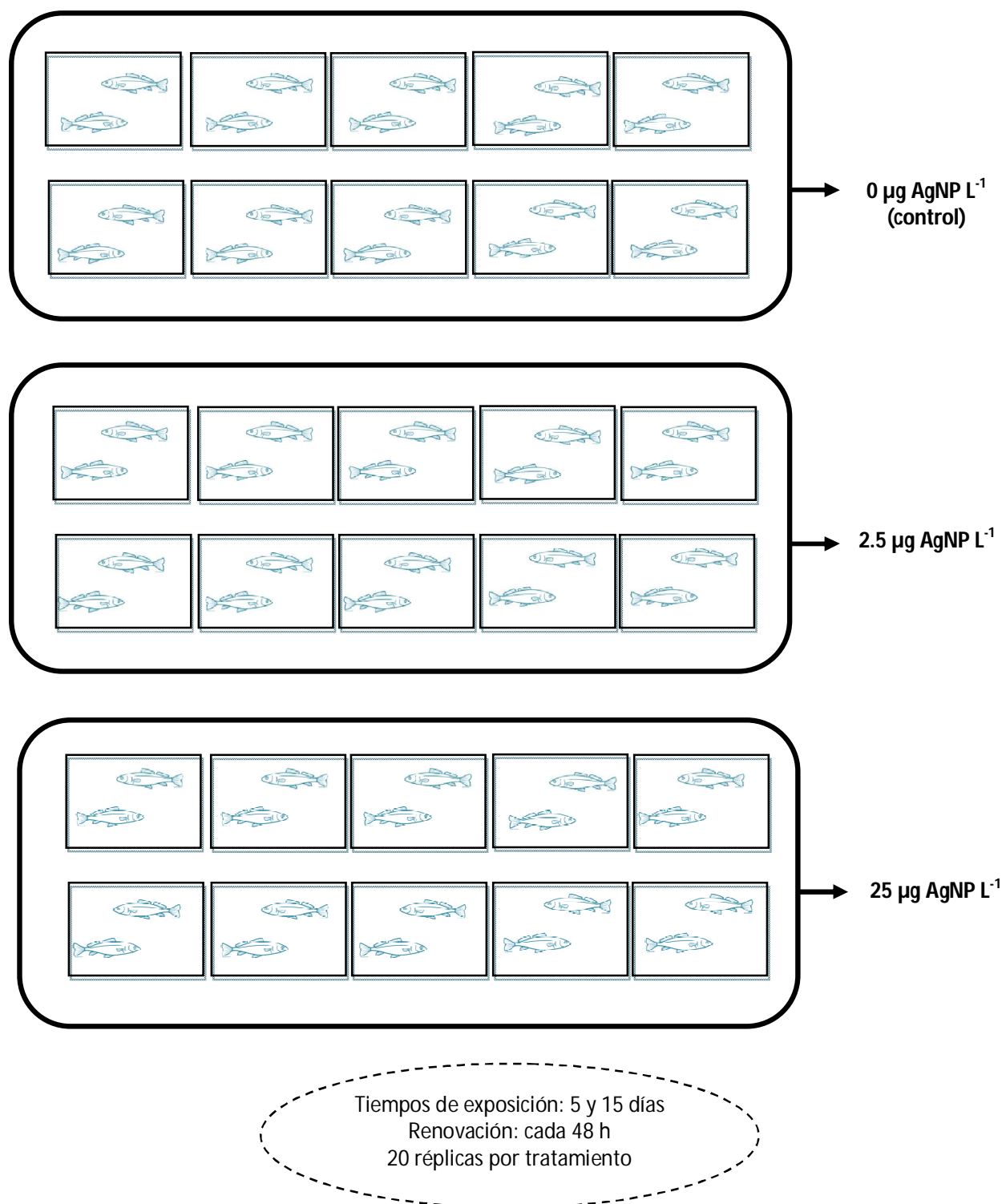


Figura 9. Esquema del diseño experimental con sábalos.

### 5.1.5 Concentración de plata en agua y tejidos

La medición de la plata en agua fue llevada a cabo de acuerdo al método 200.2 descrito por la USEPA [173]. Se tomaron muestras de agua de todos los acuarios desde el inicio (0 h) hasta finalizar el periodo de renovación, cada 12 h (0, 12, 24, 36 y 48 h). Un volumen de 100 mL de cada muestra se transfirió a vaso tipo Griffin, en donde se agregó 2 mL de ácido nítrico. Este volumen se redujo a 20 mL al calentarlo (por evaporación), el cual se siguió calentando a 85 °C durante 30 min, manteniendo el vaso cubierto con un vidrio reloj.

La preparación de los tejidos (hígado, intestino, branquias y cerebro) se realizó según el método 200.3 propuesto por la USEPA [174]. Las muestras de tejido fueron digeridas en ácido nítrico, calentándose a 95 °C y por último se dejaron enfriar. Este proceso fue repetido hasta que el tejido se disolvió completamente.

La cuantificación de Ag en agua y tejidos se llevó a cabo siguiendo el método 200.9 [173], utilizando un espectro de absorción atómica con horno de grafito (GS AAS, Perkin Elmer AAnalyst 800) equipado con auto-sampler y con límite de detección de 1  $\mu\text{g Ag L}^{-1}$  de muestra digerida. Las lecturas se realizaron con una curva de calibración utilizando un patrón calificado (Merk®). Una alícuota fue inyectada en el espectro, y las lecturas se realizaron por triplicado. La lectura media arrojada por el espectro fue utilizada para calcular la concentración de Ag total en las alícuotas digeridas de agua y tejido.

### 5.1.6 Parámetros morfométricos y hematológicos

Una vez finalizados los periodos de exposición (5 y 15 días), por cada ejemplar se midió con un ictiómetro la longitud total (LT) y estándar (medición que excluye el largo de la aleta caudal, LE) en cm, y el peso total (Pt) con una balanza de precisión en g. Además, se registró el peso fresco del hígado de cada pez (PHig). Entonces, estas medidas se utilizaron para calcular factor de condición (FC) y el índice hepatosomático (IHS) como indicadores generales del estado de los peces, según lo propuesto por Goede & Barton [175].

$$FC = Pt \times 100 / LE^3$$

$$IHS = PHig / Pt \times 100$$

El conteo de glóbulos rojos (GIR) fue realizado utilizando una cámara de Neubauer. El valor de hematocrito (Ht) se determinó a través de tubos capilares que fueron centrifugados a 1409 *g* durante 10 min. La concentración de hemoglobina (Hb) se midió según el método de cianometahemoglobina de acuerdo a Houston [176]. A partir de estos parámetros sanguíneos primarios se calcularon los siguientes índices hematimétricos derivados: hemoglobina corpuscular media (HCM), volumen corpuscular medio (VCM) y concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHC), según lo descrito en Cazenave et al. [177].

$$HCM \text{ (pg)} = Hb \times 10 / GIR$$

$$CMHC \text{ (\%)} = Hb \times 100 / Ht$$

$$VCM \text{ (}\mu\text{m}^3\text{)} = Ht \times 10 / GIR$$

Por otro lado, se realizaron dos extendidos sanguíneos por pez, los cuales fueron teñidos con May Grunwald-Giemsa [176]. El conteo de glóbulos blancos (GIB) se realizó en relación con el número de eritrocitos contados en campos seleccionados al azar, siguiendo lo propuesto por Tavares-Dias & Ruas de Moraes [178], a partir de la siguiente fórmula:

$$GIB \mu\text{L}^{-1} = \text{GIB contados en el frotis} \times \frac{GIR/\mu\text{L}}{2000 \text{ glóbulos rojos contados en el frotis}}$$

Donde:

GIR  $\mu\text{L}^{-1}$ : cantidad de glóbulos rojos por  $\mu\text{L}$  de sangre

GIB  $\mu\text{L}^{-1}$ : cantidad de glóbulos blancos por  $\mu\text{L}$  de sangre

Adicionalmente, se calculó la fórmula leucocitaria a partir del conteo diferencial de 100 células blancas por frotis, estableciéndose el porcentaje de cada componente celular (linfocitos, monocitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos) [179].

#### 5.1.7 Conteo de unidades formadoras de colonias bacterianas

Las comunidades de bacterias presentes en el mucus epidérmico de los peces fueron aisladas y analizadas según Marques et al. [180]. Brevemente, en todos los peces expuestos se tomó una muestra del mucus epidérmico con ayuda de un ansa de 5  $\mu\text{g}$  que se pasó dos veces por el flanco derecho de los ejemplares (muestra de 10  $\mu\text{g}$  en total). La muestra se transfirió a tubos de ensayo que contenían 1.300  $\mu\text{L}$  de agua esterilizada (dilución 1/130). Luego, 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra fue inoculada en cajas de Petri que contenían agar (Trypto-Casein-Soy Agar, Biokar Diagnostics) para ser incubadas a 25 °C durante 7 días. Las unidades formadoras de colonias (UFC) se contaron diariamente.

#### 5.1.8 Estrés oxidativo

Las muestras de los diferentes tejidos (hígado, intestino, branquias y cerebro) fueron homogenizadas en buffer fosfato 0.1 M (pH 6.5), el cual contenía glicerol 20%, ácido etilendiaminotetraacético 1 mM (EDTA) y ditioeritritol (DTE). El homogenato se centrifugó a 20.000  $g$  durante 30 min a 4 °C, y posteriormente el sobrenadante se recolectó y almacenó a -80 °C [181]. Las actividades enzimáticas fueron medidas colorimétricamente. La enzima superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) se determinó según Misra & Fridovich [182]. La enzima catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) según Beutler [183]. La enzima glutatión S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18) se midió utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como sustrato, según Habig et al. [184]. La actividad de la



enzima glutatión peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9) se calculó de acuerdo a Drotar et al. [185] utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustrato. Por último, la actividad enzimática de la glutatión reductasa (GR, EC 1.6.4.2) se ensayó según Tanaka et al. [186].

La capacidad antioxidante contra radicales peroxilos (*antioxidant competence against peroxyl radicals*, ACAP) se determinó a través de la cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en tejido ante la presencia y la ausencia de aplicación de un generador de radicales. Los órganos fueron homogeneizados en un buffer fosfato a pH 7.4 0.1 M ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM; KCl 0.15 M; EDTA 1 mM; 1,4-Dithiothreitol -DTT- 1 mM; glicerol 10%) y centrifugados a 10.000 *g* a 4 °C durante 20 min. Los radicales peroxilos se produjeron por descomposición térmica (37 °C) de 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (ABAP, 4 mM; Aldrich). La concentración de ROS fue medida con fluorescencia en un lector de microplaca (Synergy Biotek) con un compuesto fluorogénico, 2, 7-dichlorofluoresceindiacetate (H2DCF-DA), en una concentración final de 40  $\mu\text{M}$ , de acuerdo con la metodología descrita en Amado et al. [187] con las modificaciones propuestas por Monserrat et al. [188]. La medición de ACAP fue dada por la diferencia entre la fluorescencia medida en las muestras luego de 30 min con y sin ABAP, y fue calculada según la siguiente expresión:  $(\text{FU } 30 \text{ min}_{\text{con ABAP}} - \text{FU } 30 \text{ min}_{\text{sin ABAP}}) / \text{FU } 30 \text{ min}_{\text{sin ABAP}}$ . Los valores altos del cociente de fluorescencia fueron considerados como baja capacidad antioxidante, lo que sugiere una baja habilidad por parte de las células de neutralizar radicales peroxilos [187].

Los niveles de peroxidación lipídica (LPO) se determinaron en los tejidos a partir de la medición de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acuerdo a Yagi [189]. El homogenato utilizado para esta determinación coincidió con el correspondiente al de ACAP. A cada muestra se le adicionó butilhidroxitolueno (BHT, 4%) y ácido tricloroacético (TCA, 20% P/V), para una posterior centrifugación a 8.000 rpm durante 5 min. Luego, se le agregó ácido tiobarbitúrico (TBA, 0.7% P/V) y se centrifugó. Por último, las muestras fueron colocadas en un baño a 100 °C durante 1 h, para su posterior lectura final en espectrofotómetro a una longitud de onda  $\lambda=535 \text{ nm}$ .

En todos los casos (actividades enzimáticas, ACAP y LPO) los niveles se expresaron según el contenido de proteínas del homogenato, de acuerdo a la técnica de Bradford

[190], utilizando albúmina como estándar (Sigma). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

#### 5.1.9 Metabolitos plasmáticos y reservas energéticas

En el plasma sanguíneo de los peces se cuantificaron los niveles de glucosa (Gla), colesterol (Col), triglicéridos (Trig) y proteínas (Prot) utilizando kits colorimétricos comerciales (Wiener lab.) testeados en peces [191]. La técnica para cuantificar la Gla se basa en la medición de la enzima glucosa oxidasa obtenida del *Penicillium notatum* que presenta marcada especificidad por la D-glucosa. El ácido glucónico junto al peróxido de hidrógeno se forman por oxidación aerobia de la glucosa catalizada por esta enzima [192]. El método para la cuantificación del Col se fundamenta en que los ésteres del colesterol presentes en la muestra son hidrolizados por la enzima colesterol esterasa. El colesterol producido por esta reacción, sumado al colesterol libre de la muestra, es oxidado por una enzima denominada colesterol oxidasa con formación de peróxido de hidrógeno. Este último, en presencia de peroxidasa, oxida el cromógeno 4-Aminofenazona/fenol a un compuesto de color rojo [193].

Los Trig se determinaron a partir de la hidrólisis enzimática catalizada por la lipoproteína lipasa [194], [195]. Respecto a las Prot, la técnica se basa en la reacción de los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ion cúprico en medio alcalino para dar un complejo color violeta con máximo de absorción a 540 nm y cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales de la muestra [196].

Para determinar el contenido de glucógeno (Glo) en hígado y músculo de los peces, se utilizó el método del reactivo de antrona según Seifter et al. [197]. Las diferentes muestras fueron homogeneizadas con 0.5 mL de KOH (60%) y 1 mL de KOH (30%) y posteriormente incubadas en un baño a 100 °C durante 30 min. Tras la digestión, se adicionaron 4 mL de etanol absoluto y se dejó reposar a 4 °C overnight. Una vez transcurrido este período, las muestras se centrifugaron a 3.000 rpm durante 20 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se disolvió nuevamente con agua destilada. De esta disolución se tomó una alícuota que se hizo reaccionar con el reactivo de

antrona y se la incubó en un baño a 100 °C durante 15 min. Los tubos fueron leídos a 620 nm en espectrofotómetro y la concentración de glucógeno se determinó utilizando glucosa como estándar.

Respecto a la medición de lípidos (Lip) en tejidos, se utilizó el método de Folch et al. [198]. El mismo involucró los siguientes pasos: 1) extracción de los lípidos totales, con 1 vol de muestra y 19 vol de mezcla cloroformo/metanol (2/1) (v/v). 1a) Lavado del extracto crudo filtrado con soluciones adecuadas de sales y solventes para extraer las sustancias no lipídicas del mismo y gotas de agua. 1b) Remoción de los fosfolípidos por adsorción con ácido silícico. 2) Dosaje de trigléridos: 2a) Saponificación de los triglicéridos con KOH etanólico. 2b) Dosaje del glicerol, por oxidación del mismo con peryodato. El formaldehído producido se determina por reacción con ácido cromotrópico a 570 nm. Se utilizó trioleína como estándar.

Por último, para la determinación de proteínas (Prot) en hígado y músculo de los peces se utilizó el método del Fenol de Folin, modificado por Lowry et al. [199]. A partir del homogeneizado de las muestras, la técnica propuesta se lleva a cabo en dos etapas. En la primera, las proteínas fueron tratadas con una solución alcalina de cobre; y en la segunda se adicionó el reactivo de fenol de FolinCiocalteau, siendo su constituyente activo la mezcla ácida túngstica-molibdica. Las proteínas provocan la reducción de los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico con pérdida de 1, 2 ó 3 átomos de oxígeno del tungstato y/o molibdato, produciendo un complejo que tiene un color azul característico cuya absorbancia se midió a una longitud de onda de 660 nm. Se utilizó albumina sérica bovina como estándar. Todas las determinaciones fueron llevadas a cabo por triplicado.

#### 5.1.10 Análisis histológicos en branquias

Las muestras de arcos branquiales de los peces que fueron conservadas en PAF 4% se lavaron con agua de red, se deshidrataron según diferentes graduaciones de etanol, se lavaron en xileno, y por último se embebieron en parafina. Luego, se hicieron cortes de 7 µm de espesor, se montaron en portaobjetos y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina. El cálculo de las lesiones histopatológicas en las branquias se hizo a través del análisis

de diez secciones por muestra elegidas al azar. Además, se realizó un análisis morfométrico a partir de fotografías analizadas con el software gratuito Image J. Se tomaron las siguientes medidas: longitud de la laminilla secundaria (LLS) y espesor (ELS), distancia interlamelar (DI; en la base, zona media y ápice), y el espesor del epitelio basal (EEB) [200]. Por otro lado, se calculó la proporción de la laminilla disponible para el intercambio gaseoso (*proportion of secondary lamellae available for gas exchange*, PAGE) según Nero et al. [201] como:

$$\text{PAGE} = 100 \times (\text{media EEB}) / (\text{media EEB} + \text{media LLS})$$

Para el análisis de las histopatologías, se empleó el método semicuantitativo propuesto por Bernet et al. [202]. Las alteraciones en las branquias fueron clasificadas según los patrones de reacción (pr):

- (1) alteraciones circulatorias: resultado de una condición patológica en los fluidos de la sangre y tejidos (ej. hemorragias, aneurismas);
- (2) cambios regresivos: revelan reducción funcional o pérdida del órgano (ej. atrofias, necrosis);
- (3) cambios progresivos: conllevan un aumento de la actividad celular en los órganos (ej. hipertrofia, hiperplasia);
- (4) procesos inflamatorios: generalmente están asociados a otros patrones de reacción (ej. infiltraciones, tumores benignos o malignos).

A partir de éstos, los índices fueron calculados según la extensión de la alteración patológica ("valor score", VS) y la importancia patológica (factor de importancia, FI). Según la frecuencia de la alteración en la muestra (porcentaje de tejido que presenta un cierto tipo de alteración), un VS se le asignó de 1 a 6. Respecto a al FI, que informa acerca si la patología es reversible o no, un número de 1 a 3 fue asignado (propuesto por Bernet et al. [202]).

La suma de los FI y VS de cada patrón de reacción se expresó según el índice de patrón de reacción ( $I_{pr}$ ). Este revela el grado de lesión del órgano, y se calculó como:

$$I_{pr} = \sum_{alt} (a_{org\ pr\ alt} \times w_{org\ pr\ alt})$$

Donde:

$pr$  = patrón de reacción;  $org$  = órgano (constantes)

$alt$  = alteración

$a$  = valor score

$w$  = valor de importancia

La suma de todas las reacciones en un órgano es equivalente al índice del órgano ( $I_{org}$ ). El  $I_{org}$  en branquias ( $I_{br}$ ) se determinó como la suma de las multiplicaciones entre los factores de importancia y los valores score de un determinado patrón de reacción:

$$I_{br} = \sum_{rp} \sum_{alt} (a_{org} \times w_{org\ alt})$$

(las explicaciones de las abreviaciones coinciden con el anterior)

Por otra parte, se realizaron cortes de branquias que fueron teñidos con ácido peryódico (PAS) y alcian blue (AB) a pH 2.5 para identificar las células mucosas. Todas las secciones teñidas fueron observadas en las condiciones descriptas anteriormente. Las células de mucus (CM) fueron cuantificadas en diez secciones elegidas al azar en los filamentos de branquias, según la técnica de Sabóia-Moraes et al. [203] con modificaciones propuestas por Paulino et al. [204].

Todas las secciones fueron analizadas a partir de las imágenes capturadas utilizando un microscopio Leica Microsystem (Leica DFC 2900) a 200x, y a 400x para la cuantificación de células mucosas.

### 5.1.11 Enzimas transaminasas en branquias

Las actividades de las enzimas alanino aminotransferasa (ALT, L-alanino-2-oxaloglutarato aminotransferasa; EC 2.6.1.2) y aspartato aminotransferasa (AST, L-aspartato-2-oxaloglutarato aminotransferasa; EC 2.6.1.1) se midieron en las branquias de los peces utilizando un kit comercial (Wiener lab.), que se basa en la técnica de Reitman & Frankel [205]. La mezcla de reacción contenía 2 mmol L<sup>-1</sup>  $\alpha$ -cetoglutarato, sustratos específicos de AST y ALT (100 y 200 mmol L<sup>-1</sup> de aspartato y alanina L<sup>-1</sup>, respectivamente) en tampón fosfato (100 mM pH 7.4) según lo propuesto por Bacchetta et al. [206]. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de alícuotas del homogenato, después de 30 min de incubación a 37 °C se adicionó 2,4-dinitrofenilhidrazina y el producto de la reacción se midió espectrofotométricamente ( $\lambda=505$  nm). Cada muestra se midió por triplicado y la actividad enzimática se expresó en función del contenido de proteínas [190].

### 5.1.12 Análisis estadísticos

En todos los casos, se testeó la normalidad y homogeneidad de varianza de los datos utilizando los test Shapiro Wilks y Levene, respectivamente. Las variables que no cumplieron con alguno de estos supuestos fueron logaritmizadas ( $\log_{10}$ ) y analizadas nuevamente. Para la comparación de medias entre los diferentes tratamientos, se utilizó el análisis estadístico ANOVA de 1 vía, seguido por el test a posteriori Tukey. Para aquellas variables que no cumplieron el requisito de normalidad u homogeneidad de varianzas, se empleó el test no paramétrico Kruskal Wallis. Las diferencias entre medias se consideraron significativamente diferentes cuando el valor  $p < 0.05$ .

Adicionalmente, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el fin de obtener una interpretación holística de los efectos tóxicos generados por las AgNP. El análisis multivariado se llevó a cabo teniendo en cuenta cuatro casos por tratamiento por tiempo (N=24) y 29 variables (se consideraron aquellas que manifestaron diferencias significativas respecto al control). En todos los casos, los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software InfoStat [207].

## 5.2 Ensayos *ex vivo* con branquias de *Piaractus mesopotamicus* y *Corydoras paleatus*

### 5.2.1 AgNP, sal de plata y sustancias húmicas

Los ensayos se llevaron a cabo con el mismo stock de AgNP descrito en la sección 5.1.1. También se incluyó en el diseño experimental un tratamiento con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ , marca Tetrahydron®, n° CAS 7761-88-8, con 99% de pureza según la Hoja de Seguridad). En cuanto a las sustancias húmicas, se utilizó una sal sódica de ácidos húmicos (AH) (Sigma-Aldrich).

El ensayo se realizó con una concentración de AgNP o  $\text{AgNO}_3$  ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ). La selección de esta concentración se basó en la bibliografía disponible que evidencia efectos tóxicos de las AgNP en los organismos [73], [104], [105], [106], [121], [144], [207]. Respecto a las sustancias húmicas, se seleccionó una concentración ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) que ha demostrado efectos atenuantes con otros compuestos tóxicos [89], [209].

### 5.2.2 Peces y aclimatación

Se emplearon como especies test juveniles de *Piaractus mesopotamicus* (pacú) (Pisces, Characidae) y adultos de *Corydoras paleatus* (quitasueño) (Pisces, Callichthyidae). El pacú (Figura 10A) es un pez omnívoro sudamericano que habita en los ríos Paraná, Uruguay, Paraguay y Río de la Plata, muy utilizado en piscicultura por su buena tasa de crecimiento en cultivos, la calidad de su carne y buen mercado de comercialización [210], [211], [212]. Los ejemplares juveniles se adaptan a condiciones de laboratorio lo que permite su utilización como organismo test [169], [212], [213], [214]. Por su parte, el quitasueños (Figura 10B) es un pez neotropical con valor ornamental [215], [216]. Es una especie muy común, ampliamente distribuida en ríos y lagunas del sur de Brasil y Argentina. Presenta hábitos bénticos y un sistema de respiración aérea facultativo, por lo que tolera bajas concentraciones de oxígeno [215]. Se ha empleado en estudios de laboratorio por su fácil manipulación, pequeño tamaño y gran tolerancia [177], [209], [217], [218].



**Figura 10.** Ejemplares de *Piaractus mesopotamicus* (A) y *Corydoras paleatus* (B).

Se emplearon un total de 30 individuos de pacú ( $7.95 \pm 0.76$  cm longitud estándar;  $19.90 \pm 5.03$  g) y 132 ejemplares de quitasueños ( $3.95 \pm 0.39$  longitud estándar;  $2.52 \pm 0.74$  g). La variación en la cantidad de peces de una u otra especie se debió a la marcada diferencia de tamaño y, por lo tanto, de material biológico (branquias) necesario para las determinaciones posteriores. Los peces fueron comprados en criaderos de la región, y luego de dos semanas de aclimatación a las condiciones de laboratorio (descriptas en la sección 5.1.2) y alimentación *ad libitum*, se realizaron los ensayos.

### 5.2.3 Diseño experimental

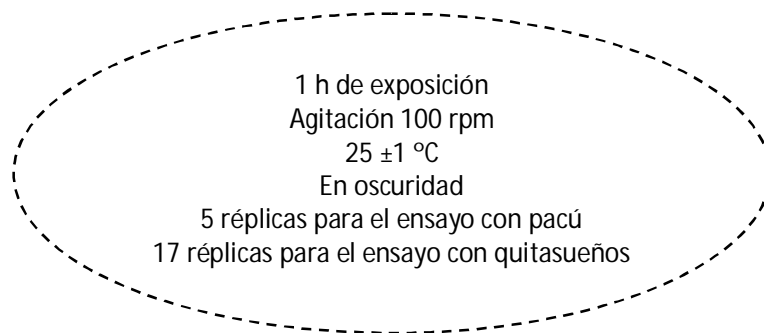
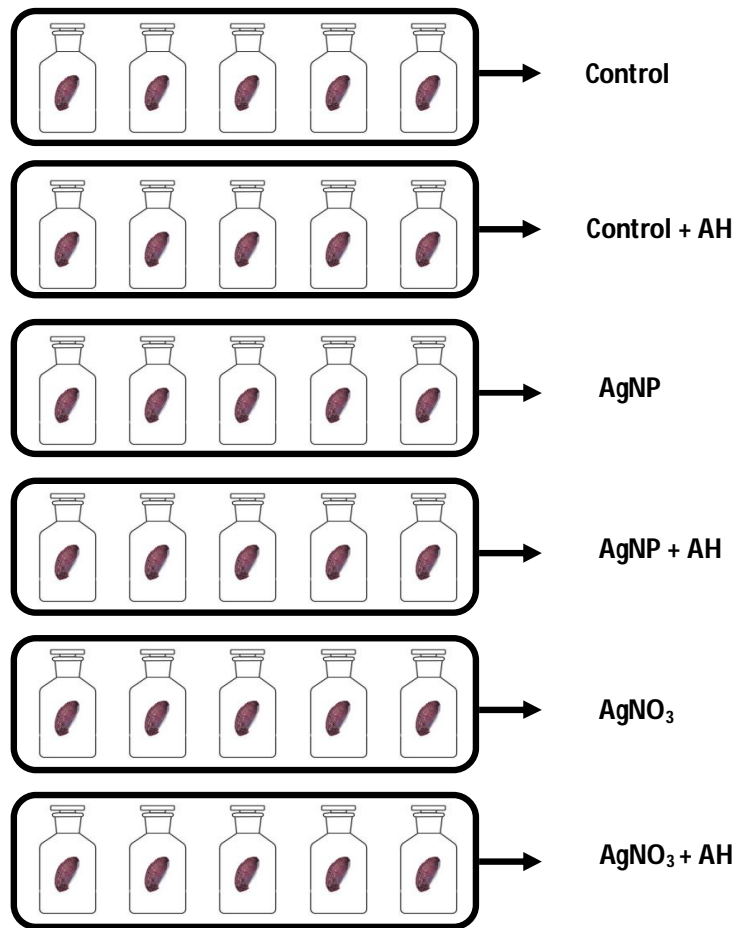
Los ensayos se llevaron a cabo según la metodología propuesta por Britto et al. [219] para branquias de peces. Luego de sacrificar los animales (pacú y quitasueños), inmediatamente se les extrajeron las branquias para sumergirlas en recipientes de vidrio color caramelo que contenían 30 mL de una solución salina compuesta por: 125 mM NaCl; 2.5 mM KCl; 0.94 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 30 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 1.25 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 10 mM glucosa, a pH 7.4.

El diseño experimental se detalla en la Figura 11. Por la gran diferencia de tamaño, cada hemibranchia (en el caso de los pacúes) o aparato branquial entero (en el caso de los quitasueños) se sumergió de forma azarosa en los frascos según los siguientes tratamientos:



- (1) Control (solución salina, SS),
- (2) Control + 10 mg AH L<sup>-1</sup>,
- (3) 100 µg AgNP L<sup>-1</sup>,
- (4) 100 µg AgNP L<sup>-1</sup> + 10 mg AH L<sup>-1</sup>,
- (5) 100 µg AgNO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>; y
- (6) 100 µg AgNO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> + 10 mg AH L<sup>-1</sup>.

El tiempo total de exposición fue de 1 h, a 25±1 °C, en condiciones de oscuridad y con agitación constante a 100 rpm. Todas las soluciones se prepararon en el día, al momento previo de ejecutar el ensayo, y la exposición al medio correspondiente fue inmediata a la disección de las branquias. Pasado el tiempo de exposición, las branquias fueron almacenadas a -80 °C hasta las posteriores determinaciones. El ensayo con pacú constó de 5 réplicas, mientras que el de quitasueños de 17 réplicas (debido a la cantidad necesaria de tejido para las determinaciones posteriores).



**Figura 11.** Ejemplo de esquema de diseño experimental con branquias de pacú (en el caso del ensayo con quitasueños hubo 17 réplicas).

#### 5.2.4 Estrés oxidativo

Siguiendo las técnicas descritas anteriormente (sección 5.1.8), se determinaron los siguientes marcadores de estrés oxidativo: enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR); medición de niveles peroxidación lipídica (LPO), y capacidad antioxidante contra radicales peroxilos (ACAP).

Adicionalmente, se determinó el contenido de glutatión reducido (GSH) utilizando la metodología propuesta por Ellman [220] con modificaciones de Venturino et al. [221]. Se mezclaron partes iguales de la fracción postmitocondrial con ácido tricloroacético (TCA) 10% y luego se centrifugó la mezcla durante diez minutos a 10.000 g. La fracción sobrenadante obtenida fue utilizada inmediatamente para evaluar el contenido de glutatión en un medio conteniendo 5,5'-Dithiobis(2- ácido nitrobenzoico) (DTNB) 1.5 mM y buffer fosfato de potasio 0.25 M pH 8,0. Los tioles ácido-solubles fueron cuantificados en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 midiendo la absorbancia a 412 nm y utilizando una curva de calibración con GSH puro como estándar.

#### 5.2.5 Análisis estadísticos

Se llevaron a cabo los análisis estadísticos descritos en la sección 5.1.12 para testear la normalidad, homogeneidad de varianza de los datos, y comparación de medias entre los tratamientos.

### 5.3 Ensayos *in vivo* con el bivalvo marino *Mytilus galloprovincialis*

#### 5.3.1 Caracterización de las AgNP

Los ensayos también se realizaron con nanoplatina coloidal nanArgen® a partir de diluciones de una solución stock (10.000 ppm) producida y comercializada por la empresa Nanotek SA (Argentina). Para caracterizarlo, se llevaron a cabo las mismas determinaciones descriptas en la sección 5.1.1: microscopía de transmisión electrónica (TEM), análisis de energía dispersiva (EDS), microscopía electrónica de barrido (SEM), y liberación de iones  $\text{Ag}^+$  en el medio de solución.

#### 5.3.2 Moluscos y aclimatación

Este ensayo se llevó a cabo en la ciudad de Siena (Italia) en el marco de una pasantía de investigación. La especie de molusco marino utilizada como organismos test en este estudio fue *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mytilidae) (Figura 12). El cultivo de esta especie alcanza varios miles de toneladas anuales en China (abarca la mayor producción), Sudáfrica, España, Ucrania (entre otros países europeos), por lo que es un ítem alimentario de suma importancia para la población humana [222]. El género *Mytilus* sp., abundante en las costas marinas y estuarios, representa un modelo pertinente para caracterizar los potenciales impactos por parte de las nanopartículas [161].



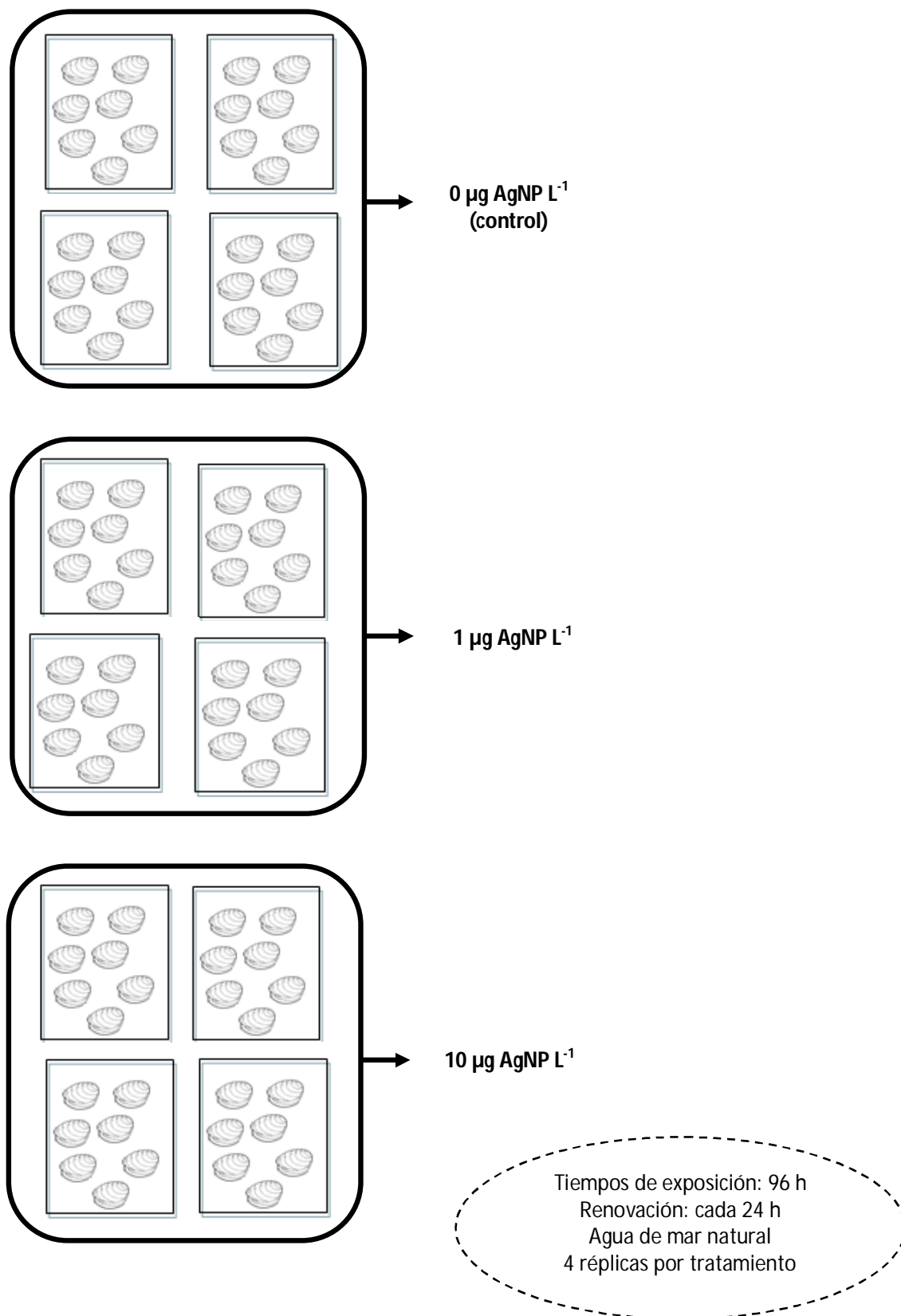
Figura 12. Ejemplares de *Mytilus galloprovincialis*.

Los moluscos adultos fueron comprados de un criadero acuícola (Arborea, OR, Italia) ( $n=90$  aproximadamente;  $6.56 \pm 0.22$  cm). Inmediatamente, se colocaron de a 7-8 ejemplares en estanques de 7 L que contenían agua de mar natural (AMN), que fue previamente recolectada de un área prístina en la Bahía de Talamone (GR, Italia). Se determinaron los parámetros del AMN: 1.3% carbono orgánico total,  $6.6 \text{ mg L}^{-1}$  de oxígeno total,  $18 \pm 1$  °C temperatura promedio,  $40 \pm 1\%$  de salinidad y pH  $8 \pm 0.1$ . La aclimatación fue de 48 h, donde el AMN se renovó diariamente. Las condiciones de laboratorio fueron: luz-oscuridad natural y temperatura de  $18 \pm 1$  °C.

### 5.3.3 Diseño experimental

Para seleccionar las concentraciones de AgNP subletales a testear, se tuvieron en cuenta los niveles ambientalmente relevantes [68] así como estudios previos que demostraron efectos tóxicos en el molusco *M. galloprovincialis* [109], [110], [223]. Los tratamientos entonces consistieron en la exposición a: 0  $\mu\text{g}$  (control); 1  $\mu\text{g}$  y 10  $\mu\text{g}$  AgNP  $\text{L}^{-1}$  durante 96 h. Se colocaron 7 moluscos en acuarios que contenían 7 L de AMN, y cada tratamiento constó de cuatro réplicas (Figura 13). Los moluscos no fueron alimentados durante el ensayo, dado que el AMN proveía una fuente de alimento natural. Todos los tratamientos fueron renovados cada 24 h (cambio del 100% del AMN y las respectivas concentraciones de AgNP). Antes de llevar a cabo las renovaciones, el stock de AgNP fue sonificado 30 min, y las diluciones (preparadas en agua ultrapura) otros 15 min en un sonicador HD 2070 Bandelin Electronic (Berlin), para romper los posibles agregados. Las soluciones finales fueron preparadas en AMN y mezcladas con vórtex. Los parámetros físicos (temperatura, salinidad y pH) del AMN se midieron diariamente. Se tomaron muestras de agua diariamente al inicio (0 h) y al final de la renovación (24 h) con el fin de medir la concentración total de Ag en el agua.

Luego de 96 h, se prosiguió a extraer la hemolinfa de los moluscos desde el músculo aductor con agujas estériles, y luego sacrificarlo para la disección de la glándula digestiva y las branquias.



**Figura 13.** Esquema del diseño experimental con moluscos marinos.

#### 5.3.4 Concentración de plata en agua y tejido blando

La cuantificación de Ag total en tejido blando se llevó a cabo por espectrometría de absorción atómica [173]. Al momento de la escritura de este manuscrito de Tesis queda pendiente la medición de Ag en el medio de exposición de todos los tratamientos del diseño experimental.

#### 5.3.5 Desestabilización de la membrana lisosomal

La determinación de la desestabilización de la membrana lisosomal (DML) se llevó a cabo a través del método "Neutral Red Retention Time, NRRT" según la técnica de Lowe et al. [224]. La hemolinfa de los moluscos se diluyó en una solución salina fisiológica (Hepes 20mM, NaCl 436 mM, MgSO<sub>4</sub> 53 mM, KCl 12 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM) en una relación 1:1. Una alícuota de 200 µL se dejó adherir en un portaobjeto de vidrio durante 1 h en condiciones de humedad a 18 °C. Los hemocitos entonces adheridos, se incubaron con 200 µL con una solución diluida de rojo neutro (Sigma-Aldrich) con solución fisiológica, y luego de 15 min los portaobjetos fueron lavados con solución salina dos veces. Los citoplasmas teñidos de los hemocitos se observaron en un microscopio óptico (Olympus U-25ND6) a 80x en intervalos de 15 min, para determinar el tiempo en que el 50% de las células muestra el citoplasma teñido fuertemente, lo que indica que la célula dejó de retener por fuera el colorante para que no ingresara por las membranas lisosomales.

#### 5.3.6 Test de micronúcleos

El test de conteo de micronúcleos (MN) fue realizado a partir de una muestra de hemolinfa de los moluscos. La misma fue diluida en EDTA 10 mM en una relación 1:1 en solución fisiológica salina. Una alícuota de 400 µL se ubicó en un portaobjeto, y se lo dejó secar durante 1 h a 4 °C para que se adhiriera. Luego, cada portaobjeto se ubicó en un hellendal que contenía metanol frío y se lo mantuvo a -20 °C durante 20 min. Por último, se retiraron del hellendal y se los dejó secar durante 1 h bajo campana. Luego, se ubicaron los portaobjetos en otros hellendal que contenía una solución de

Giemsa al 6% (diluido en agua ultrapura), y se los dejó durante 20 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos, ya coloreados, fueron sellados con un cubreobjetos. Entonces, se prosiguió a realizar el conteo de MN con el microscopio óptico (Olympus U-25ND6) a 80x. Las células micronucleadas se clasificaron según el criterio general aceptado para moluscos: citoplasma bien preservado, MN que no tocan el núcleo central, MN teñido similar o menor que el núcleo central y tamaño menor a 1/3 de del núcleo central [225].

### 5.3.7 Estrés oxidativo

Las glándulas digestivas de los moluscos se homogenizaron para obtener la fracción postmitocondrial (S9) según Regoli et al. [227]. Por cada muestra, una porción de 0.5 g de tejido se homogenizó en un buffer sucrosa ( $K_2HPO_4$  50 mM, sucrosa 0.75 M, EDTA 1 mM, DTT 0.5 mM, phenylmethanesulfonyl fluoride -PMSF- 400  $\mu$ M, leupeptin 10  $\mu$ M, pepstatin A 1  $\mu$ M, aprotinin 1 mg  $L^{-1}$ , a pH 7.5) en una proporción 1:4 peso/volumen. Las muestras fueron centrifugadas (Centrifuge Eppendorf 5804-R) a 12.000 *g* durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante (S9) se almacenó inmediatamente a -80° C.

La actividad de la enzima CAT (EC 1.11.1.) se calculó según su función de peroxidasa con el método espectrofotométrico propuesto por Regoli et al. [226]. Para su lectura, se depositó en cubetas de cuarzo buffer fosfato pH 7 (a 20 °C),  $H_2O_2$  (150 mM, diluido en buffer fosfato) y la fracción S9. Cada muestra fue leída por triplicado.

La enzima GST (EC 2.5.1.18) se midió según la técnica espectrofotométrica de Habig et al. [184]. La medición fue llevada a cabo en microplacas donde se aplicó 1.5 mM CDNB (coeficiente de extinción 9.6  $mM^{-1} cm^{-1}$ ) en un buffer 0.1 M  $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$  (pH 7.42), 1.5 mM GSH en un buffer in 0.1 M  $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$  y la fracción S9 fue entonces diluida en el buffer de homogenización. El aumento de la absorbancia fue medido en un intervalo de 3 min.

Los niveles de peroxidación lipídica (LPO) fueron medidos a través de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBA) según un método de cuantificación de



malondialdehído (MDA), un producto secundario del proceso de peroxidación [228]. Por cada muestra, se tomó una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  del S9 para agregarle buffer fosfato 0.1 M (pH 7.4) y una solución 20% TCA-0.01% BHT, para luego centrifugarla a 7.300 rpm a 4 °C durante 10 min. Una alícuota de 400  $\mu\text{L}$  del homogenato resultante se mezcló con una solución 0.6 M HCl y 25 mM TRIS-120 mM TBA (pH 7.9), y se la incubó a 80 °C durante 15 min. El sobrenadante fue medido espectrofotométricamente ( $\lambda=530$  nm) para cuantificar el contenido de MDA. En todos los casos, las mediciones se realizaron por triplicado y los valores se expresaron en función del contenido de proteínas [190] utilizando albúmina bovina como estándar.

### 5.3.8 Metalotioneínas

El contenido de metalotioneínas (MT) se midió en la glándula digestiva de los moluscos según la técnica de Viarengo et al. [229]. El tejido se homogenizó en un buffer (0.5 M sucrose, 20 mM Tris, 0.006 mM leupeptina, 0.5 PMSF y 0.01%  $\beta$ -mercaptoethanol, pH 8.6) y luego se centrifugó a 15.300 rpm durante 20 min. El homogenato fue purificado con una solución de etanol frío/cloroformo y de nuevo centrifugado a 6.000  $g$  por 10 min. Luego, al sobrenadante se le agregó HCl 37% y tres volúmenes de etanol frío. Después, las muestras se dejaron reposar a -20 °C durante 1 h, para luego centrifugarlas a 6.000  $g$  por 10 min y descartar el sobrenadante. El pellet restante fue lavado con una solución etanol/cloroformo/buffer de homogenización anti-proteasa y centrifugado a 6.000  $g$  por 10 min. El sobrenadante fue descartado, y los pellets se dejaron secar luego de una evaporación en flujo de nitrógeno. Para resuspender la fracción que contiene las MT, se les agregó una solución 0.25 M NaCl y 1 N HCl en EDTA 4 mM. La concentración de MT fue entonces cuantificada con valoración espectrofotométrica ( $\lambda=420$  nm) de los residuos sulfhídricos según la reacción de Ellman. Una solución de DTNB 0.43 mM en buffer fosfato 0.2 M (pH 8) y NaCl 2 M fue agregada, y luego la muestra se centrifugó a 3000  $g$  durante 5 min. El contenido de MT se calculó en función de una curva estándar de glutatión.

### 5.3.9 Actividad de transportadores de membrana

Luego del periodo de exposición, las branquias de los moluscos fueron cuidadosamente diseccionadas y se mantuvieron en AMN para la toma de biopsias (Acu Punch, 6 mm Ø). La actividad de los transportadores de membranas se midió según la técnica de Luckenbach & Epel [230]. La incubación de las biopsias de las branquias se hizo en cajas de Petri de vidrio de 10 mL de volumen. Se plantearon los siguientes grupos experimentales: 10 mL AMN filtrada (control), 10 mL AMN filtrada con Calceína-AM (Ca-AM) 0.25  $\mu$ M como sustrato, y 10 mL de AMN filtrada con Ca-AM y 0.20  $\mu$ M MK571 como inhibidor. Las cajas de Petri fueron incubadas en la oscuridad en agitación muy suave a temperatura ambiente. Después de 90 min de incubación, las biopsias se lavaron en AMN filtrada y se sonicaron de manera individual (30 s, 5 ciclos, 20 v de potencia) en un buffer de lisis (10 mM Tris, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4). Las muestras obtenidas fueron centrifugadas a 13.000 *g* por 10 min a 4 °C, y una alícuota de 200  $\mu$ L del sobrenadante se transfirió a una microplaca negra para una lectura fluorométrica en un equipo Victor 3 1420 Multilabel Counter (Wallak) ( $\lambda_{\text{excitación}}$ =485 nm y  $\lambda_{\text{emisión}}$ =530 nm). Para determinar el contenido de Ca-AM, los valores fueron calculados utilizando una curva Ca-AM como referencia. La actividad final se expresó en Unidades Arbitrarias de Florescencia (UAF), en función del contenido de proteínas (Bradford, 1976).

### 5.3.10 Análisis estadísticos

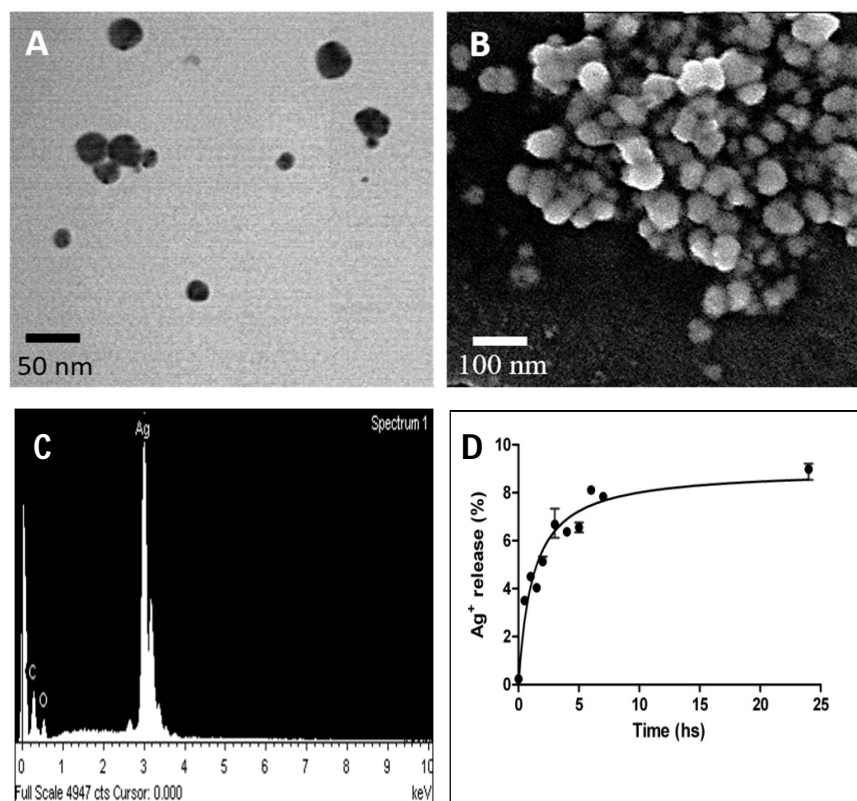
Se llevaron a cabo los análisis estadísticos de descriptos en la sección 5.1.12 para testear la normalidad, homogeneidad de varianza de los datos, y comparación de medias entre los tratamientos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Ensayos *in vivo* con *Prochilodus lineatus*

#### 6.1.1 Caracterización de las AgNP

Las imágenes del análisis por microscopía de transmisión electrónica (TEM) mostraron que las nanopartículas eran esféricas de un tamaño promedio de  $29 \pm 8$  nm (Figura 14A). El análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) confirmó las observaciones del TEM (Figura 14B). El análisis de energía dispersiva (EDS) mostró el pico de señal en el caso de la región de Ag, lo que confirmó que es su componente principal (Figura 14C). La plata (72.39%) fue el mayor constituyente en comparación con el carbono (9.76%) y el oxígeno (17.85%), como se muestra en la Tabla 3. La señal débil para el oxígeno podría provenir de las moléculas de polivinilpirrolidona que estaban en la superficie de las AgNP como agentes estabilizantes. Por otro lado, las AgNP fueron altamente estables dado que la liberación de iones Ag en el medio acuoso fue sólo de un 8% en 24 h, como lo determinó la medición por espectrometría de absorción atómica (Figura 14D).



**Figura 14.** Microscopía de transmisión electrónica (A), microscopía electrónica de barrido (B), espectro de espectroscopia de energía dispersiva (C), porcentaje de iones Ag<sup>+</sup> en suspensión después de 24 h (D).

Elemento	Peso %	Atómico %
C K	9.76	31.25
O K	17.85	42.93
Ag L	72.39	25.82
Totales	100.00	

**Tabla 3.** Espectro de espectroscopia de energía dispersiva de las AgNP.

### 6.1.2 Ensayo preliminar: Determinación de $CL_{50}$

En el grupo control y la menor concentración ensayada ( $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$ ) no se registró mortalidad de los organismos expuestos. En los demás tratamientos ( $41.66$ ,  $69.44$  y  $115.74 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$ ) se observó un aumento en la mortalidad según la dosis:  $40$ ,  $60$  y  $100\%$ , respectivamente. El análisis Probit arrojó un valor de  $CL_{50-96h}$  de  $53.84 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$ , con un  $95\%$  de confianza e intervalos de  $35.29$ - $82.18$ .

### 6.1.3 Concentración de plata en agua y tejidos

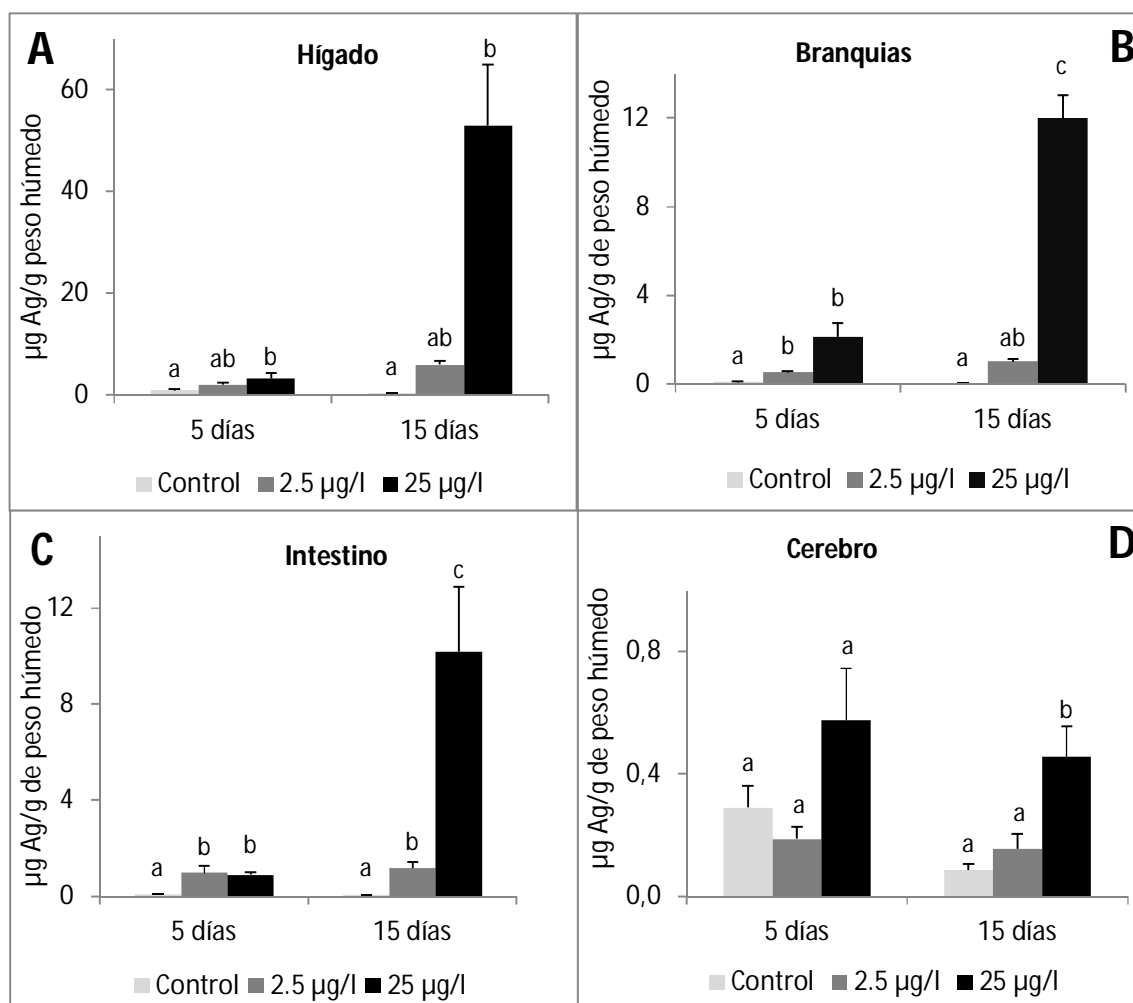
Respecto al medio de exposición de los peces, se detectaron niveles de Ag total correspondientes a un  $95$ - $100\%$  de las concentraciones nominales de AgNP. Además, no hubo diferencias significativas de niveles de Ag total entre el inicio ( $0$  h) y el momento de renovación de los tratamientos ( $48$  h) (Tabla 4). No se registró mortalidad de los individuos durante los periodos de exposición ( $5$  ó  $15$  días).

	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h
<b>Control</b>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
<b><math>2.5 \mu\text{g L}^{-1}</math></b>	$2.47 \pm 0.14$	$2.56 \pm 0.23$	$2.55 \pm 0.16$	$2.50 \pm 0.13$	$2.46 \pm 0.10$
<b><math>25 \mu\text{g L}^{-1}</math></b>	$25.13 \pm 0.16$	$23.04 \pm 0.69$	$23.78 \pm 0.69$	$24.45 \pm 0.37$	$22.55 \pm 0.99$

**Tabla 4.** Concentración de plata total medida en el medio de exposición ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Los valores se expresan como medias  $\pm$  EE. <LD: por debajo del límite de detección ( $1 \mu\text{g Ag L}^{-1}$  de muestra digerida).

En cuanto al contenido de Ag total en los tejidos, los mayores niveles se registraron según la siguiente secuencia: hígado>branquias>intestino>cerebro (Figura 15). El hígado (Figura 15A) presentó un aumento de la concentración de Ag luego de ambos periodos de exposición ( $p_{5 \text{ días}}=0.0130$ ;  $p_{15 \text{ días}}=0.0001$ ). Además, en el caso de la exposición a  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  se observó que luego del mayor tiempo de exposición los niveles de Ag fueron  $16$  veces mayores respecto al periodo corto. En cuanto a las branquias (Figura 15B), los niveles de Ag total aumentaron luego de la exposición a ambas concentraciones de AgNP y a ambos periodos de exposición ( $p_{5 \text{ días}}=0.0045$ ;  $p_{15 \text{ días}}=0.0019$ ), y luego de  $15$  días los

niveles fueron 5 veces mayores que a los 5 días de exposición en el caso de  $25 \mu\text{g L}^{-1}$ . En el intestino (Figura 15C), los niveles de Ag aumentaron luego de ambas concentraciones de AgNP y tiempos de exposición, y éstos fueron 11 veces mayores en el caso de 15 días respecto a los 5 días en la mayor concentración ensayada ( $p_{5 \text{ días}}=0.0002$ ;  $p_{15 \text{ días}}<0.0001$ ). Por último, en el cerebro de los peces (Figura 15D) hubo un aumento significativo en el caso de la exposición de 15 días a  $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  ( $p=0.0041$ ).



**Figura 15.** Concentración de plata en hígado (A), branquias (B), intestino (C) y cerebro (D) de *Prochilodus lineatus* expuestos a 2.5 y  $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  durante 5 y 15 días. Los valores se expresan como medias  $\pm$  EE. Las medias que no comparten el mismo suscripto (a, b o c) en cada columna son significativamente diferentes a  $p<0.05$ .

#### 6.1.4 Parámetros morfométricos y hematológicos

La Tabla 5 muestra los resultados de los parámetros morfométricos y hematológicos. Todos los cambios significativos ocurrieron luego de la exposición a la mayor concentración de AgNP ( $25 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Luego de ambos tiempos de exposición (5 y 15 días), el índice hepatosomático (IHS) aumentó ( $p_{5 \text{ días}} > 0.0001$ ;  $p_{15 \text{ días}} = 0.0012$ ). Los glóbulos rojos (GIR) y la concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHC) aumentaron luego de la exposición a 5 días ( $p = 0.0021$  y  $p = 0.0005$ , respectivamente). Pasados los 15 días de exposición, la hemoglobina corpuscular media (HCM) y la cantidad de linfocitos disminuyó significativamente ( $p = 0.0391$  y  $p = 0.0004$ , respectivamente). La cantidad de monocitos aumentó luego de ambos períodos de exposición ( $p_{5 \text{ días}} = 0.0032$ ;  $p_{15 \text{ días}} = 0.0006$ ), y la cantidad de glóbulos blancos (GIB) luego de 15 días ( $p = 0.0002$ ).

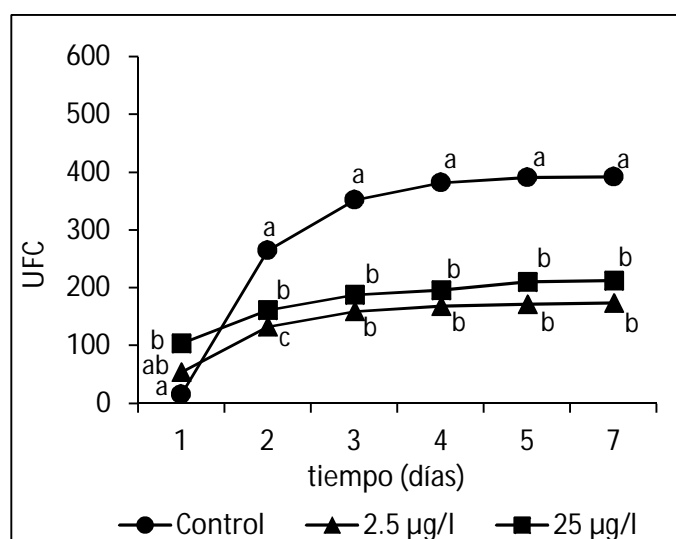
	5 días			15 días		
	Control	2.5 µg L <sup>-1</sup>	25 µg L <sup>-1</sup>	Control	2.5 µg L <sup>-1</sup>	25 µg L <sup>-1</sup>
IHS	0.44 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.48 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.07 <sup>b</sup>
FC	2.14 ± 0.06	2.15 ± 0.03	2.09 ± 0.04	2.07 ± 0.07	1.95 ± 0.07	1.92 ± 0.06
GIR (10 <sup>6</sup> µl <sup>-1</sup> )	3.81 ± 0.16 <sup>a</sup>	3.83 ± 0.16 <sup>a</sup>	4.61 ± 0.17 <sup>b</sup>	2.06 ± 0.09	2.00 ± 0.14	2.23 ± 0.12
Ht (%)	43.77 ± 1.83	44.79 ± 1.65	47.03 ± 1.55	40.85 ± 1.56	39.07 ± 2.66	41.29 ± 1.39
Hb (g dL <sup>-1</sup> )	9.55 ± 0.35	8.90 ± 0.24	10.09 ± 0.43	9.34 ± 0.28	8.35 ± 0.58	9.25 ± 0.37
VCM (µm <sup>3</sup> )	118.48 ± 8.59	118.32 ± 8.93	116.55 ± 8.06	193.84 ± 10.85	194.32 ± 15.63	172.96 ± 11.39
HCM (pg)	25.13 ± 1.37	23.50 ± 0.94	21.46 ± 2.04	46.45 ± 1.53 <sup>a</sup>	41.09 ± 2.04 <sup>ab</sup>	38.80 ± 2.99 <sup>b</sup>
CMHC (%)	21.72 ± 0.54 <sup>a</sup>	19.76 ± 0.41 <sup>a</sup>	25.20 ± 0.86 <sup>b</sup>	23.89 ± 0.79	21.45 ± 1.01	22.39 ± 0.32
GIB (µL)	7687 ± 992	6290 ± 1460	7532 ± 1777	1709 ± 227 <sup>a</sup>	2914 ± 484 <sup>a</sup>	6947 ± 722 <sup>b</sup>
Linfocitos (%)	89.21 ± 8.67	83.495 ± 7.26	73.86 ± 10.40	93.06 ± 5.30 <sup>a</sup>	88.1 ± 6.22 <sup>a</sup>	69.84 ± 8.68 <sup>b</sup>
Neutrófilos (%)	0.28 ± 0.62	0.56 ± 1.24	1.12 ± 1.17	0	0	0
Eosinófilos (%)	5.62 ± 5.29	5.66 ± 5.56	0.81 ± 1.26	0	0.90 ± 1.34	0.72 ± 0.66
Monocitos (%)	4.89 ± 4.09 <sup>a</sup>	10.30 ± 4.24 <sup>a</sup>	24.21 ± 10.97 <sup>b</sup>	6.94 ± 5.29 <sup>a</sup>	11.00 ± 6.43 <sup>a</sup>	29.44 ± 8.66 <sup>b</sup>

**Tabla 5.** Parámetros morfológicos y hematológicos de *Prochilodus lineatus* expuestos a 2.5 y 25 µg AgNP L<sup>-1</sup> durante 5 y 15 días. Los valores se expresan como medias ± EE. Las medias que no comparten el mismo suscripto (a, b o c) en cada columna son significativamente diferentes a p<0.05.



### 6.1.5 Conteo de unidades formadoras de colonias bacterianas

La Figura 16 muestra los valores medios obtenidos en el conteo de unidades formadoras de colonias bacterianas (UFC) presentes en el mucus epidérmico de los peces. Luego que los ejemplares estuvieron expuestos a AgNP por 15 días, la toma de muestra de mucus reveló diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 14). Luego del día 1, el mucus inoculado que se tomó de los peces del tratamiento control mostró menos cantidad de UFC que los peces expuestos a AgNP ( $p=0.0118$ ). A partir del día 2 hasta el día 7 (final del conteo), el número de UFC disminuyó significativamente ( $p<0.0001$ ) en las muestras provenientes de los tratamientos con AgNP, con respecto al control.



**Figura 16.** Valores medios del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) a partir de muestras de mucus de *Prochilodus lineatus* expuestos a 2.5 y 25 µg AgNP L<sup>-1</sup> durante 15 días. Las medias que no comparten el mismo subíndice (a, b o c) son significativamente diferentes a  $p<0.05$ .

### 6.1.6 Estrés oxidativo

Las actividades de las enzimas antioxidantes, los niveles de peroxidación lipídica (LPO) y la capacidad antioxidante contra radicales peroxilos (ACAP) en hígado, branquias, intestino y cerebro están resumidos en la Tabla 6.

En el hígado de los peces se detectó un aumento de todas las enzimas antioxidantes en el caso de la exposición a  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  por 15 días ( $p_{\text{SOD}}=0.0094$ ;  $p_{\text{CAT}}=0.0357$ ;  $p_{\text{GST}}=0.0275$ ;  $p_{\text{GR}}=0.0019$ ;  $p_{\text{GPx}}=0.0011$ ). Además, la capacidad antioxidante disminuyó (es decir, aumentaron las unidades de fluorescencia) ( $p=0.0276$ ), mientras que los niveles de LPO no evidenciaron cambios. Respecto a la exposición a AgNP por 5 días, en el caso de la menor concentración de AgNP ( $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) hubo aumento de la actividad de la enzima CAT ( $p=0.0034$ ) y de los niveles de LPO ( $p=0.0039$ ).

En las branquias de los peces se evidenció una disminución de todas las actividades enzimáticas luego de 5 días de exposición a ambas concentraciones de AgNP ( $p_{\text{SOD}}=0.0094$ ,  $p_{\text{CAT}}=0.0357$ ,  $p_{\text{GST}}=0.0275$ ,  $p_{\text{GR}}=0.0019$ ,  $p_{\text{GPx}}=0.0011$ ). Luego de 15 días de exposición, la capacidad antioxidante disminuyó (hubo un aumento de las unidades de fluorescencia) en los peces expuestos a  $2.5 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  ( $p=0.0060$ ), y los valores de LPO aumentaron en el caso de la mayor concentración ( $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$ ) ( $p=0.0467$ ).

En el intestino, sólo se evidenció un aumento de la actividad de SOD ( $p=0.0411$ ) luego de 5 días de exposición a  $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$ . Finalmente, en el cerebro de los peces, las actividades de las enzimas antioxidantes SOD y GST aumentaron luego de 15 días de exposición a  $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  ( $p=0.0120$  y  $p=0.0036$ , respectivamente). En ambos tejidos no se registraron diferencias en los niveles de LPO o ACAP respecto al control.

	5 días			15 días		
	Control	2.5 µg L <sup>-1</sup>	25 µg L <sup>-1</sup>	Control	2.5 µg L <sup>-1</sup>	25 µg L <sup>-1</sup>
<i>Hígado</i>						
SOD	169.18 ± 24.97	98.57 ± 17.14	113.54 ± 4.15	138.15 ± 25.36 <sup>a</sup>	102.20 ± 7.33 <sup>a</sup>	352.83 ± 34.96 <sup>b</sup>
CAT	47.09 ± 2.90 <sup>a</sup>	56.49 ± 11.18 <sup>b</sup>	41.75 ± 4.07 <sup>a</sup>	54.49 ± 5.86 <sup>a</sup>	49.67 ± 5.56 <sup>a</sup>	108.36 ± 29.59 <sup>b</sup>
GST	154.76 ± 35.46	176.62 ± 14.13	180.74 ± 23.52	257.29 ± 26.29 <sup>a</sup>	253.56 ± 32.47 <sup>a</sup>	616.85 ± 148.74 <sup>b</sup>
GR	52.44 ± 6.77	42.29 ± 3.54	41.49 ± 4.23	38.30 ± 4.45 <sup>a</sup>	41.41 ± 3.35 <sup>a</sup>	133.75 ± 30.94 <sup>b</sup>
GPx	204.39 ± 30.72	171.59 ± 31.25	165.59 ± 18.26	215.06 ± 30.07 <sup>a</sup>	167.52 ± 22.39 <sup>a</sup>	605.13 ± 144.21 <sup>b</sup>
LPO	0.45 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.42 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.07	0.40 ± 0.06	0.45 ± 0.03
ACAP	2.32 ± 0.28	2.46 ± 0.21	2.48 ± 0.14	2.01 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.47 ± 0.06 <sup>ab</sup>	3.21 ± 0.42 <sup>b</sup>
<i>Branquias</i>						
SOD	141.65 ± 19.96 <sup>a</sup>	72.05 ± 9.38 <sup>b</sup>	76.57 ± 10.20 <sup>b</sup>	95.72 ± 15.56	130.48 ± 15.29	99.65 ± 7.98
CAT	12.87 ± 1.62 <sup>a</sup>	7.41 ± 0.82 <sup>b</sup>	9.54 ± 1.14 <sup>ab</sup>	13.67 ± 3.28	10.58 ± 1.54	12.57 ± 2.91
GST	292.6 ± 41.59 <sup>a</sup>	159.21 ± 18.05 <sup>b</sup>	181.17 ± 27.12 <sup>b</sup>	146.37 ± 19.54	201.70 ± 42.02	191.94 ± 7.37
GR	62.69 ± 8.81 <sup>a</sup>	30.65 ± 3.14 <sup>b</sup>	44.67 ± 7.22 <sup>b</sup>	53.05 ± 16.43	49.28 ± 10.51	49.22 ± 4.18
GPx	355.53 ± 34.36 <sup>a</sup>	196.15 ± 19.49 <sup>b</sup>	230.40 ± 37.65 <sup>b</sup>	277.67 ± 50.11	289.48 ± 48.78	223.85 ± 15.83
LPO	0.28 ± 0.09	0.31 ± 0.07	0.47 ± 0.04	0.88 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.16 <sup>ab</sup>	1.48 ± 0.26 <sup>b</sup>
ACAP	0.25 ± 0.02	0.37 ± 0.11	0.35 ± 0.05	0.62 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.48 ± 0.69 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.09 <sup>a</sup>
<i>Intestino</i>						
SOD	152.13 ± 33.93 <sup>a</sup>	85.71 ± 9.28 <sup>ab</sup>	50.79 ± 10.58 <sup>b</sup>	121.7 ± 10.32	113.48 ± 21.90	73.97 ± 8.71
CAT	11.89 ± 2.33	8.35 ± 1.47	6.83 ± 0.27	10.35 ± 2.35	10.59 ± 2.30	7.92 ± 1.14
GST	310.95 ± 71.26	266.93 ± 22.89	282.99 ± 37.07	237.92 ± 19.83	361.96 ± 99.08	268.50 ± 70.27
GR	52.94 ± 14.80	38.05 ± 6.09	59.33 ± 10.12	34.84 ± 5.31	39.50 ± 4.96	39.11 ± 6.34
GPx	349.45 ± 77.67	269.20 ± 46.25	364.77 ± 58.03	205.04 ± 12.28	230.21 ± 48.15	194.51 ± 26.94
LPO	0.89 ± 0.07	0.66 ± 0.07	0.95 ± 0.10	1.99 ± 0.20	1.57 ± 0.13	1.74 ± 0.12
ACAP	1.20 ± 0.15	1.01 ± 0.19	1.23 ± 0.09	1.65 ± 0.30	1.77 ± 0.42	1.60 ± 0.31

*Cerebro*

SOD	132.57 ± 8.60	157.29 ± 11.43	157.34 ± 15.56	106.06 ± 12.15 <sup>a</sup>	104.32 ± 6.06 <sup>a</sup>	190.14 ± 30.52 <sup>b</sup>
CAT	8.83 ± 0.24	10.06 ± 2.46	8.12 ± 1.32	6.8 ± 0.70	5.48 ± 0.07	7.52 ± 1.14
GST	162.53 ± 30.80	212.61 ± 45.95	159.87 ± 27.11	118.13 ± 16.55 <sup>a</sup>	105.93 ± 12.07 <sup>a</sup>	187.46 ± 31.23 <sup>b</sup>
GR	54.85 ± 2.28	71.21 ± 7.71	57.65 ± 14.21	45.03 ± 5.74	28.03 ± 5.04	45.73 ± 8.28
GPx	216.70 ± 34.90	297.71 ± 60.93	226.35 ± 30.99	170.95 ± 4.78	149.79 ± 4.22	220.88 ± 38.50
LPO	0.40 ± 0.12	0.24 ± 0.03	0.50 ± 0.12	0.18 ± 0.004	0.13 ± 0.00	0.16 ± 0.02
ACAP	0.55 ± 0.08	0.58 ± 0.07	0.42 ± 0.07	0.53 ± 0.05	0.75 ± 0.02	0.68 ± 0.07

**Tabla 6.** Actividades de las enzimas SOD, CAT, GST, GR y GPx, y niveles de ACAP y LPO en hígado, branquias, intestino y cerebro de *Prochilodus lineatus* expuestos a 2.5 y 25 µg AgNP L<sup>-1</sup> durante 5 y 15 días. Las actividades enzimáticas están expresadas en: U SOD mg prot<sup>-1</sup> (SOD), U mg prot<sup>-1</sup> (CAT), y mU mg prot<sup>-1</sup> (GST, GR y GPx). Los niveles de LPO en nmol TBARS mg prot<sup>-1</sup>, y los niveles de ACAP en ΔUF (unidades de fluorescencia). Los valores se expresan como medias ± EE. Las medias que no comparten el mismo subíndice (a, b o c) en cada columna son significativamente diferentes a p<0.05.

#### 6.1.7 Metabolitos plasmáticos y reservas energéticas

La Tabla 7 resume los resultados obtenidos. Todos los cambios significativos fueron registrados luego de la exposición a la mayor concentración de AgNP ( $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$ ). En plasma, la glucosa plasmática (Gla), proteínas (Prot) y triglicéridos (Trig) aumentaron luego de 5 días de exposición ( $p < 0.0001$ ,  $p = 0.0055$  y  $p = 0.0072$ , respectivamente). Sólo en el caso de los Trig los niveles se mantuvieron altos luego de 15 días ( $p = 0.0002$ ).

En cuanto a las reservas energéticas tisulares, los cambios observados se registraron luego de 15 días de exposición: el glucógeno (Glo) aumentó sus niveles tanto en el hígado como en el músculo ( $p = 0.0001$  y  $p = 0.0002$ , respectivamente), y en el caso del músculo también se evidenció un aumento de las Prot ( $p = 0.0015$ ). Los niveles de colesterol (Col) no mostraron cambios significativos entre los tratamientos.

	5 días			15 días		
	Control	2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	25 $\mu\text{g L}^{-1}$	Control	2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	25 $\mu\text{g L}^{-1}$
<i>Plasma</i>						
Glucosa ( $\text{g L}^{-1}$ )	$0.38 \pm 0.03^a$	$0.51 \pm 0.05^a$	$0.91 \pm 0.06^b$	$0.45 \pm 0.06$	$0.42 \pm 0.05$	$0.63 \pm 0.03$
Proteínas ( $\text{g dL}^{-1}$ )	$3.43 \pm 0.12^a$	$3.42 \pm 0.03^a$	$4.08 \pm 0.15^b$	$10.99 \pm 1.66$	$15.64 \pm 2.10$	$15.92 \pm 1.48$
Triglicéridos ( $\text{g L}^{-1}$ )	$1.66 \pm 0.17^a$	$2.07 \pm 0.32^{ab}$	$3.14 \pm 0.09^b$	$0.65 \pm 0.16^a$	$0.23 \pm 0.02^a$	$2.29 \pm 0.61^b$
Colesterol ( $\text{g L}^{-1}$ )	$4.29 \pm 0.11$	$3.96 \pm 0.22$	$4.63 \pm 0.07$	$3.29 \pm 0.49$	$2.77 \pm 0.40$	$2.85 \pm 0.16$
<i>Hígado</i>						
Glucógeno ( $\mu\text{mol g th}^{-1}$ )	NM	NM	NM	$246.44 \pm 5.63^a$	$247.54 \pm 41.13^a$	$733.96 \pm 86.32^b$
Proteínas ( $\text{mg g th}^{-1}$ )	$144.59 \pm 16.06$	$142.47 \pm 13.50$	$117.20 \pm 5.50$	$170.14 \pm 35.06$	$132.78 \pm 14.20$	$121.31 \pm 3.36$
Lípidos ( $\mu\text{mol g th}^{-1}$ )	$12.928 \pm 0.36$	$10.57 \pm 1.66$	$11.26 \pm 1.09$	$8.82 \pm 0.89$	$10.76 \pm 0.65$	$9.14 \pm 0.21$
<i>Músculo</i>						
Glucógeno ( $\mu\text{mol g th}^{-1}$ )	$0.37 \pm 0.06$	$0.35 \pm 0.04$	$0.37 \pm 0.06$	$0.55 \pm 0.03^a$	$0.63 \pm 0.03^a$	$1.46 \pm 0.17^b$
Proteínas ( $\text{mg g th}^{-1}$ )	$86.01 \pm 9.64$	$75.14 \pm 9.12$	$71.08 \pm 11.83$	$143.66 \pm 6.82^a$	$126.97 \pm 15.17^a$	$58.02 \pm 13.54^b$
Lípidos ( $\mu\text{mol g th}^{-1}$ )	$5.78 \pm 0.76$	$5.24 \pm 0.28$	$5.41 \pm 0.54$	$4.13 \pm 0.50$	$3.53 \pm 0.32$	$3.40 \pm 0.17$

**Tabla 7.** Metabolitos plasmáticos y reservas energéticas tisulares (en hígado y músculo) de *Prochilodus lineatus* expuestos a 2.5 y 25  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  durante 5 y 15 días. Los valores se expresan como medias  $\pm$  EE. Las medias que no comparten el mismo suscripto (a, b o c) en cada columna son significativamente diferentes a  $p < 0.05$ . NM: no medido, th: tejido húmedo.

### 6.1.8 Análisis histológicos en branquias

La Tabla 8 muestra los resultados obtenidos en el análisis morfométrico de las branquias e índices histopatológicos calculados. Respecto a los análisis morfométricos, la longitud de la laminilla secundaria (LLS) disminuyó significativamente en el caso de la exposición a  $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$  durante 5 días ( $p=0.0001$ ). Luego de 15 días, en el caso de la mayor concentración ( $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$ ) se evidenciaron aumentos en espesor de las laminillas secundarias (ELS) ( $p<0.0001$ ) y en la distancia interlamelar (DI) ( $p_{\text{ápice}}=0.0320$ ;  $p_{\text{base}}<0.0001$ ). La  $DI_{\text{zona media}}$  aumentó pero en el caso de la exposición de 5 días ( $p<0.0001$ ) a  $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$ . A pesar de estos cambios, la proporción de la laminilla disponible para el intercambio gaseoso (PAGE) no se vio afectada en ninguno de los tratamientos o tiempos de exposición.

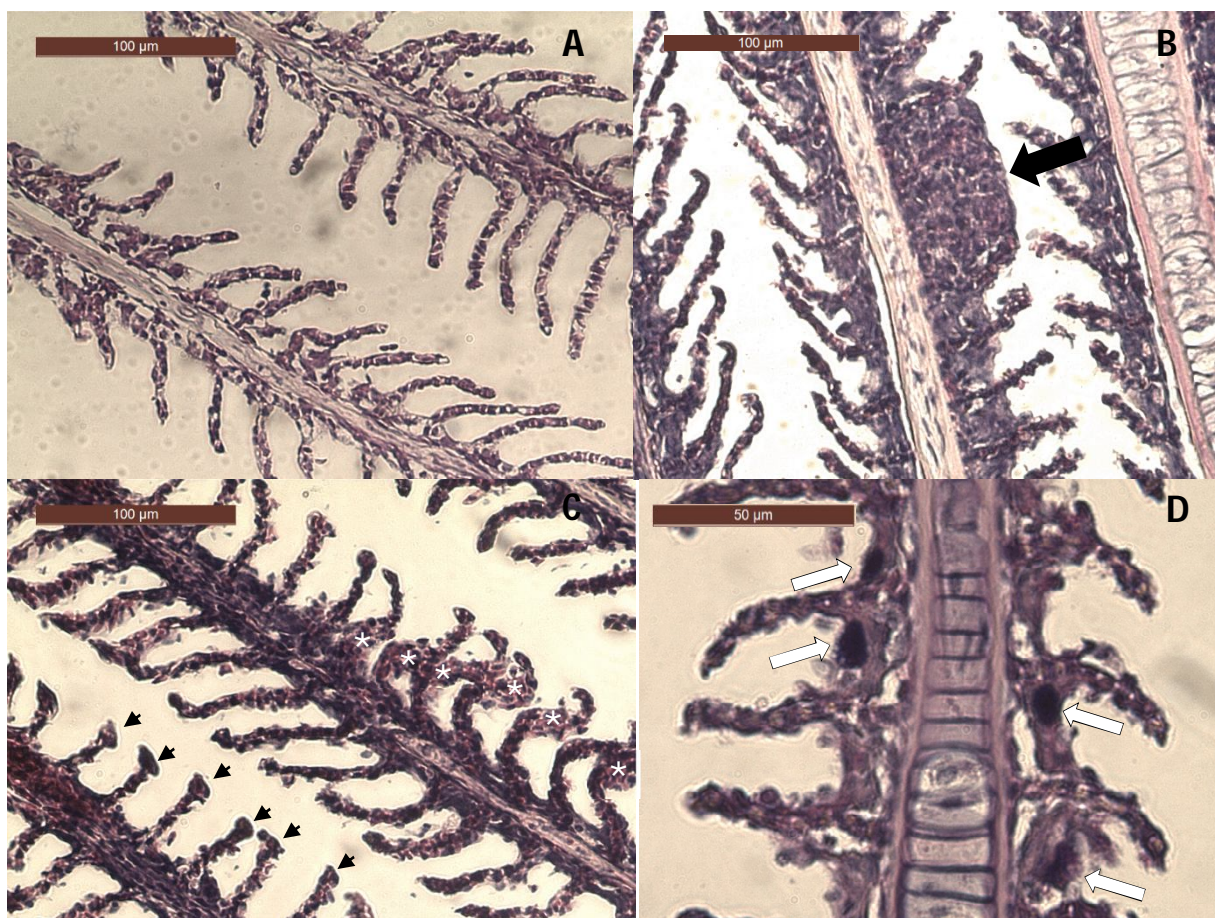
Las alteraciones histológicas halladas en las branquias incluyeron hemorragias, aneurismas, hipertrofia y fusiones (Figura 17). Estas patologías se clasificaron en dos patrones de reacción: alteraciones circulatorias (patrón de reacción,  $rp_1$ ) y cambios progresivos ( $rp_3$ ). Los índices de patrón de reacción ( $lrp_1$ ,  $lrp_3$ ) (Tabla 8) no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. El índice del órgano (branquia,  $l_{br}$ ), por su parte, se vio significativamente aumentado en el caso de la mayor concentración y tiempo de exposición ( $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  durante 15 días) ( $p=0.0407$ ).

Por último, el conteo de células de mucus (CM) mostró un aumento significativo luego de la exposición a ambas concentraciones de AgNP por 15 días ( $p<0.0001$ ) (Tabla 8, Figura 17D).

	5 días			15 días		
	Control	2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	25 $\mu\text{g L}^{-1}$	Control	2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	25 $\mu\text{g L}^{-1}$
LLS ( $\mu\text{m}$ )	31.39 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	27.85 $\pm$ 0.82 <sup>b</sup>	31.72 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	32.54 $\pm$ 0.54	33.54 $\pm$ 0.73	34.76 $\pm$ 0.70
ELS ( $\mu\text{m}$ )	4.22 $\pm$ 0.15	3.88 $\pm$ 0.09	3.76 $\pm$ 0.09	3.85 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	3.79 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	4.42 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>
DI ( $\mu\text{m}$ )						
Ápice	7.49 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	7.13 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	7.87 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	8.63 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	9.91 $\pm$ 0.52 <sup>ab</sup>	10.19 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>
Zona media	6.17 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	6.77 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	7.78 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	7.61 $\pm$ 0.31	8.58 $\pm$ 0.34	8.60 $\pm$ 0.35
Base	8.60 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	8.40 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	7.73 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	8.29 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	8.89 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	10.22 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>
EEB ( $\mu\text{m}$ )	7.62 $\pm$ 0.45 <sup>ab</sup>	8.23 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	6.52 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	5.72 $\pm$ 0.18 <sup>ab</sup>	5.92 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	6.65 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>
PAGE	81.12 $\pm$ 0.90	77.21 $\pm$ 1.71	82.48 $\pm$ 0.54	84.81 $\pm$ 0.48	84.39 $\pm$ 0.72	85.07 $\pm$ 0.52
Irp <sub>1</sub>	9.50 $\pm$ 1.19	9.50 $\pm$ 1.44	9.25 $\pm$ 0.75	12.00 $\pm$ 0.00	12.00 $\pm$ 0.00	12.00 $\pm$ 0.00
Irp <sub>3</sub>	13.00 $\pm$ 4.33	13.50 $\pm$ 4.50	20.50 $\pm$ 2.60	1.00 $\pm$ 0.71	1.50 $\pm$ 1.50	10.00 $\pm$ 3.65
I <sub>br</sub>	22.50 $\pm$ 3.23	23.00 $\pm$ 3.14	29.75 $\pm$ 1.93	12.33 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	13.50 $\pm$ 1.50 <sup>ab</sup>	22.00 $\pm$ 3.65 <sup>b</sup>
CM	45.75 $\pm$ 4.01	36.00 $\pm$ 3.94	35.75 $\pm$ 11.97	8.50 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	20.50 $\pm$ 1.89 <sup>b</sup>	107.25 $\pm$ 11.52 <sup>c</sup>

**Tabla 8.** Análisis morfométricos e índices histopatológicos en las branquias de *Prochilodus lineatus* expuestos a 2.5 y 25  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  durante 5 y 15 días. Los valores se expresan como medias  $\pm$  EE. Las medias que no comparten el mismo suscripto (a, b o c) en cada columna son significativamente diferentes a  $p < 0.05$ .

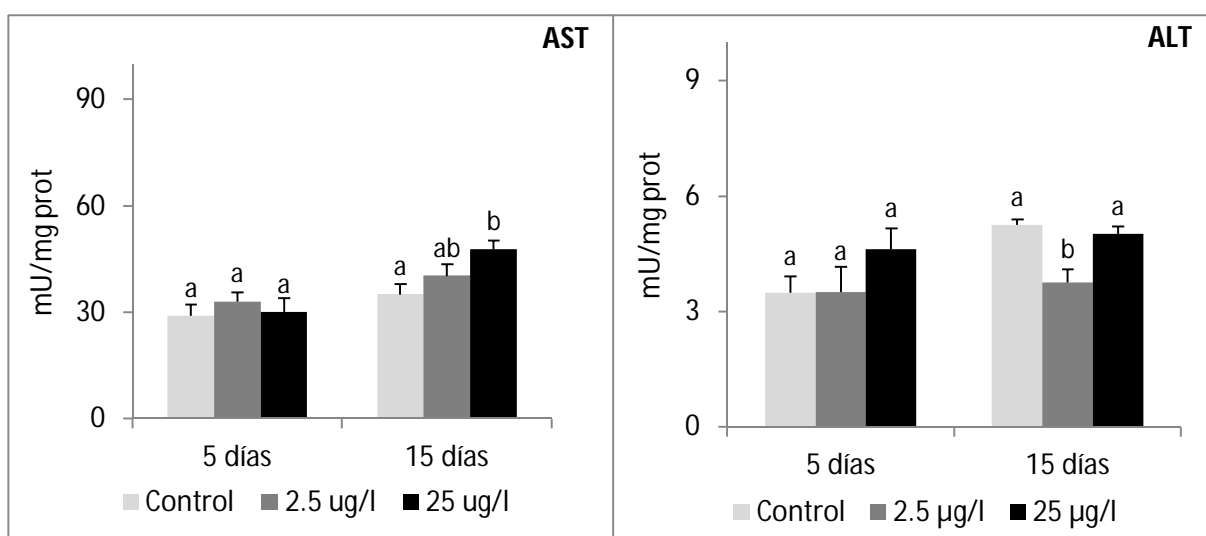




**Figura 17.** Secciones transversales de las branquias de *Prochilodus lineatus* expuestos a 2.5 y 25  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  durante 5 y 15 días. Estructura normal de la branquia que muestra las laminillas secundarias sin lesiones (A), con fusión total (flecha negra) de las laminillas (B), con aneurismas (cabeza de flecha) y hemorragias (asteriscos) (C); y células de mucus (flechas blancas) (D).

### 6.1.9 Enzimas transaminasas en branquias

Las actividades de las enzimas transaminasas alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) están graficadas en la Figura 18. En el caso de la exposición de 5 días a AgNP, no se evidenciaron diferencias entre los tratamientos. Luego de 15 días de exposición, la actividad de AST aumentó significativamente en el caso de 25  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  ( $p=0.0213$ ). Por su parte, la ALT disminuyó en las branquias expuestas a 2.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $p=0.0019$ ).



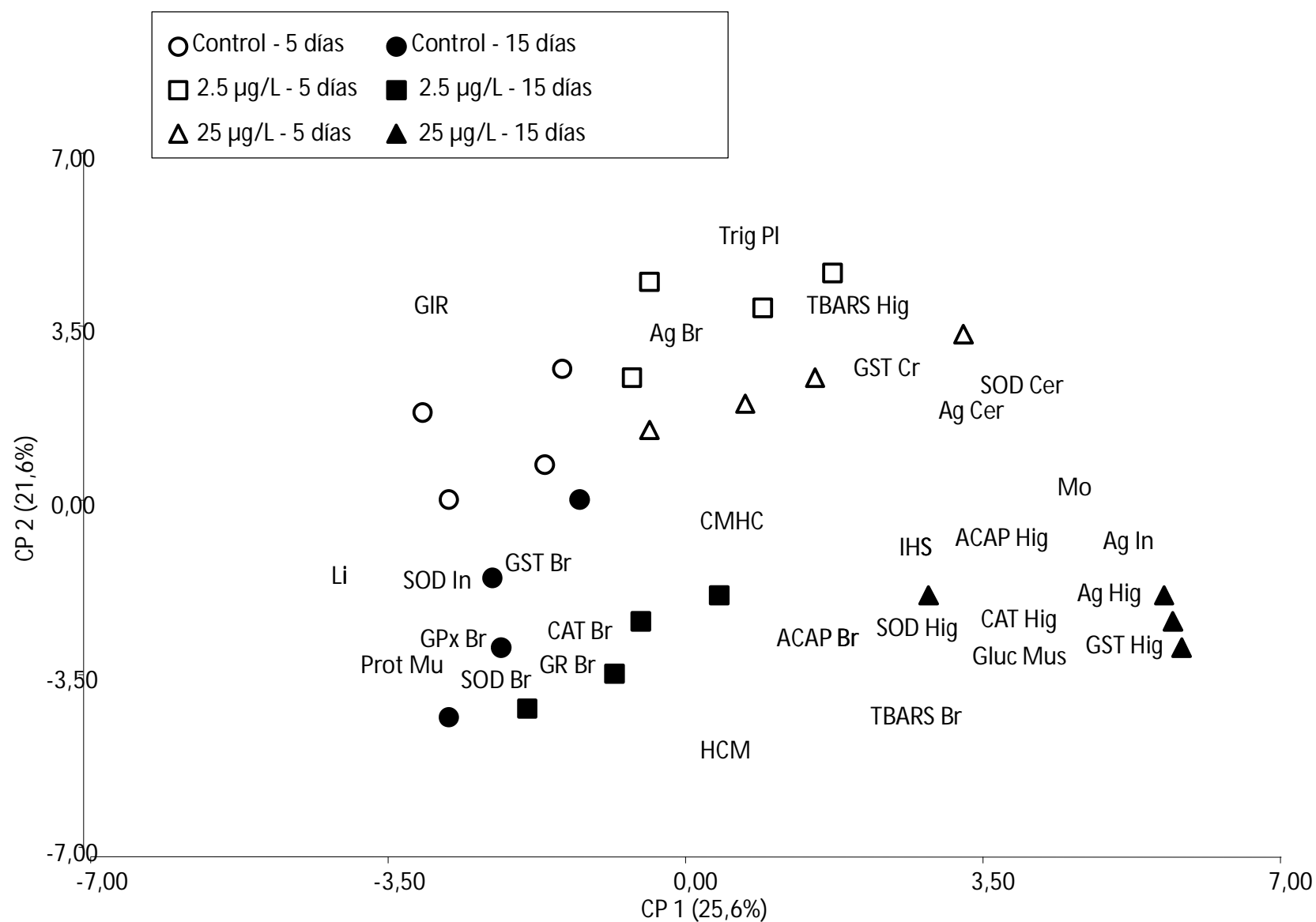
**Figura 18.** Valores medios ( $\pm$  EE) de las actividades de las enzimas AST y ALT en las branquias de *Prochilodus lineatus* expuestos a 2.5 y 25  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  durante 5 y 15 días. Las medias que no comparten el mismo suscripto (a, b o c) en cada columna son significativamente diferentes a  $p<0.05$ .

#### 6.1.10 Análisis multivariado

El análisis de componentes principales (ACP) (Figura 19) mostró que la mayor parte de la varianza total de los datos (47.2%) puede explicarse por los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2). La interpretación de los componentes principales puede llevarse a cabo a través del análisis de los autovalores de la matriz de datos  $>1$ . El ACP indicó que 7 autovalores cumplieron este requisito. Además, los coeficientes de correlación son significativos cuando son mayores que  $\sqrt{d/n}$ , siendo  $d$  el número de autovalores y  $n$  el número de variables. Entonces los coeficientes de correlación  $>0,49$  fueron indicativos de una buena representación de las variables en el ACP.

El primer componente (CP1) explicó el 25.6% del total de la inercia de los datos y ordenó principalmente los tratamientos (Control, 2.5 y 25  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). De esta forma, sobre el CP1 se distinguen claramente los ejemplares controles (sobre el lado izquierdo) de los expuestos a AgNP. Las correlaciones positivas para el CP1 fueron: IHS, monocitos, glucosa en músculo, SOD en hígado, ACAP en hígado, SOD en cerebro, Ag en cerebro, CAT en hígado, GST en hígado, Ag en hígado y Ag en intestino. Las negativas fueron: glóbulos rojos, HCM, proteínas en músculo, SOD en intestino y GPx en branquias.

El CP2 (21.6% de la varianza total) separó los tiempos de exposición (5 y 15 días). Este eje mostró correlaciones positivas para: glóbulos rojos, glóbulos blancos, Ag en branquias, triglicéridos en plasma y LPO en hígado. Las correlaciones negativas fueron: HCM, glucosa en músculo, proteínas en músculo, SOD en branquias, CAT en branquias, GR en branquias, LPO en branquias y GST en branquias.



**Figura 19.** Representación de los biomarcadores (en letras) e individuos (en dibujos) en el primer plano factorial del análisis de componentes principales. Se representaron en el ACP los biomarcadores con coeficientes de correlación  $>0,49$ . Las abreviaturas de los biomarcadores están explicadas en el texto, a excepción de: Ag (acumulación de Ag), Li (linfocitos), Mo (monocitos), PI (plasma), In (intestino), Br (branquias), Hig (hígado), Cer (cerebro).

## 6.2 Ensayos *ex vivo* con branquias de *Piaractus mesopotamicus* y *Corydoras paleatus*

### 6.2.1 Estrés oxidativo

Todos los resultados de los parámetros de estrés oxidativo se muestran en la Tabla 9 según los tratamientos (1) control (solución salina); (2) control + 10 mg de ácido húmico (AH) L<sup>-1</sup> (3) 100 µg AgNP L<sup>-1</sup>; (4) 100 µg AgNP L<sup>-1</sup> + 10 mg AH L<sup>-1</sup>; (5) 100 µg AgNO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>; y (6) 100 µg AgNO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> + 10 mg AH L<sup>-1</sup>.

En el caso de las branquias de pacú (*Piaractus mesopotamicus*), se evidenció un aumento de la enzima antioxidante CAT ( $p=0.0099$ ) luego de la exposición tanto de AgNP como a AgNO<sub>3</sub>, mientras que este efecto se vio mitigado cuando el ácido húmico (AH) estuvo presente en la solución.

Respecto a las branquias del quitasueños (*Corydoras paleatus*), la exposición a AgNO<sub>3</sub> causó una disminución significativa de la concentración de GSH ( $p=0.0023$ ) y de la actividad de la enzima GST ( $p=0.0024$ ). Por otra parte, las AgNP provocaron un aumento en los niveles de peroxidación lipídica (LPO) ( $p=0.0047$ ). En todos los casos los efectos se vieron atenuados cuando el AH estuvo presente en el medio de solución.

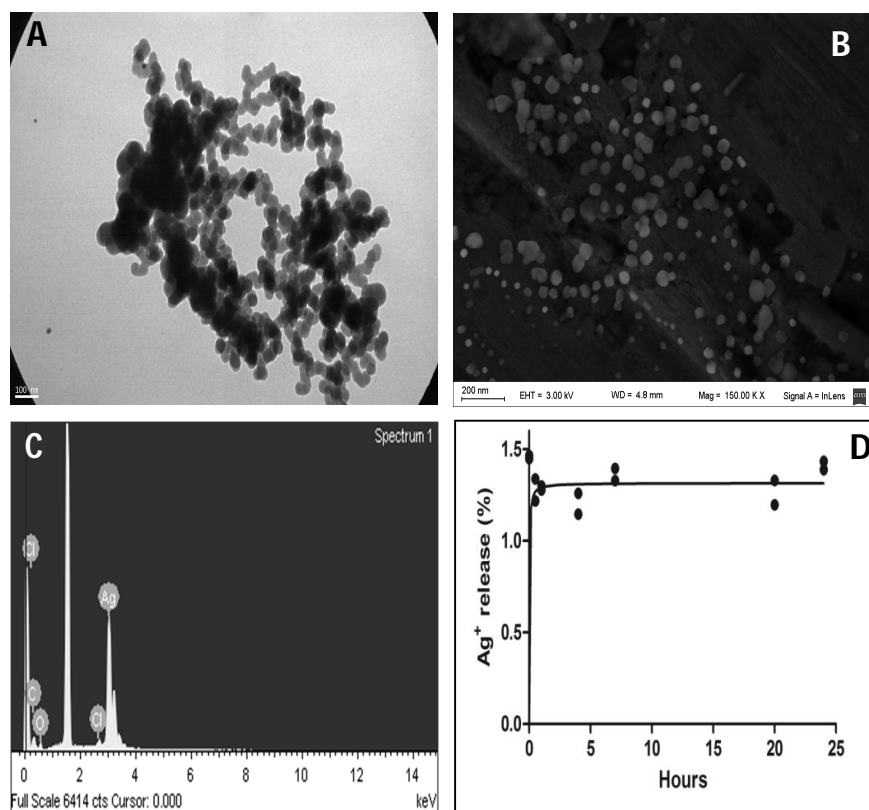
	SOD	CAT	GST	GR	GPx	LPO	ACAP	GSH
<i>Piaractus mesopotamicus</i>								
Control	34.01 ± 11.34	1127.86 ± 141.2 <sup>a</sup>	34.243 ± 10.42	10.92 ± 1.37	118.75 ± 23.15	0.22 ± 0.03	2.72 ± 0.65	225.95 ± 37.66
Control + AH	34.97 ± 16.55	1405.39 ± 321.21 <sup>ab</sup>	45.83 ± 11.37	11.21 ± 1.30	119.91 ± 25.99	0.25 ± 0.04	2.17 ± 0.49	229.49 ± 41.98
AgNP	34.61 ± 6.87	1802.12 ± 438.78 <sup>b</sup>	40.59 ± 9.45	11.29 ± 1.64	115.21 ± 12.46	0.23 ± 0.04	2.11 ± 0.47	226.04 ± 13.05
AgNP + AH	33.12 ± 13.43	1519.87 ± 243.75 <sup>ab</sup>	39.63 ± 19.84	9.05 ± 3.06	118.72 ± 41.18	0.29 ± 0.05	3.80 ± 1.43	231.97 ± 35.14
AgNO <sub>3</sub>	34.23 ± 17.15	1875.02 ± 77.23 <sup>b</sup>	44.21 ± 12.74	11.89 ± 2.45	115.07 ± 18.25	0.22 ± 0.06	2.27 ± 0.34	255.99 ± 42.22
AgNO <sub>3</sub> + AH	33.10 ± 16.11	1225.85 ± 245.39 <sup>ab</sup>	36.66 ± 1.42	9.62 ± 1.78	123.04 ± 29.94	0.34 ± 0.05	4.49 ± 0.49	238.48 ± 46.61
<i>Corydoras paleatus</i>								
Control	25.82 ± 8.60	4702.90 ± 1219.99	167.79 ± 41.41 <sup>c</sup>	35.05 ± 12.65	106.91 ± 11.94	0.66 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.21 ± 0.28	314.64 ± 26.14 <sup>b</sup>
Control + AH	26.42 ± 10.80	4045.03 ± 832.82	154.48 ± 22.96 <sup>bc</sup>	28.61 ± 12.68	120.87 ± 36.73	0.70 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.13	294.13 ± 26.02 <sup>b</sup>
AgNP	32.71 ± 6.06	5143.49 ± 1293.8	108.23 ± 26.67 <sup>abc</sup>	33.5 ± 4.72	156.01 ± 56.05	0.98 ± 0.16 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.38	258.35 ± 70.15 <sup>ab</sup>
AgNP + AH	22.23 ± 6.83	4588.79 ± 2098.54	108.45 ± 48.92 <sup>ab</sup>	33.84 ± 16.91	124.3 ± 65.78	0.72 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.32	302.32 ± 9.37 <sup>b</sup>
AgNO <sub>3</sub>	34.75 ± 6.50	4694.83 ± 465.32	66.65 ± 2.13 <sup>a</sup>	33.14 ± 5.7	127.7 ± 13.14	0.47 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.09 ± 0.22	192.98 ± 48.63 <sup>a</sup>
AgNO <sub>3</sub> + AH	39.03 ± 8.36	4485.36 ± 1711.9	111.32 ± 8.11 <sup>abc</sup>	27.6 ± 11.1	138.32 ± 21.52	0.59 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.24 ± 0.14	258.34 ± 26.10 <sup>ab</sup>

**Tabla 9.** Actividades de las enzimas SOD, CAT, GST, GR y GPx, y niveles de ACAP, LPO y GSH en branquias de *Piaractus mesopotamicus* y *Corydoras paleatus* expuestas a 100 µg AgNP y AgNO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, y 10 mg L<sup>-1</sup> AH durante 1 h. Las actividades enzimáticas están expresadas en: U SOD mg prot<sup>-1</sup> (SOD), U mg prot<sup>-1</sup> (CAT), y mU mg prot<sup>-1</sup> (GST, GR y GPx). Los niveles de LPO en nmol TBARS mg prot<sup>-1</sup>, los niveles de ACAP en ΔUF (unidades de fluorescencia) y los de GSH en nmol mg prot<sup>-1</sup>. Los valores se expresan como medias ± EE. Las medias que no comparten el mismo suscripto (a, b o c) en cada columna son significativamente diferentes a p<0.05.

### 6.3 Ensayos *in vivo* con el bivalvo marino *Mytilus galloprovincialis*

#### 6.3.1 Caracterización de las AgNP

De manera similar al primer stock usado de AgNP (sección 6.1.1, Figura 19), el análisis TEM demostró que las nanopartículas eran esféricas con un tamaño promedio de  $30 \pm 10$  nm (Figura 19A). El análisis SEM confirmó las observaciones del TEM (Figura 19B). El análisis EDS también mostró señales fuertes en el caso de la región de Ag (debido a que es su componente principal) y débiles para el oxígeno (Figura 19C). La plata fue el mayor constituyente (81.59%) (Tabla 10). Las AgNP se mostraron muy estables en el medio de solución con una liberación de iones  $\text{Ag}^+$  del 1.3% en 24 h (Figura 19D).



**Figura 19.** Microscopía de transmisión electrónica (A), microscopía electrónica de barrido (B), espectro de espectroscopía de energía dispersiva (C), porcentaje de iones  $\text{Ag}^+$  de la suspensión de AgNP después de 24 h (D).

Elemento	Peso (%)	Atómico (%)
C K	3.06	12.99
O K	14.99	47.78
Cl K	0.49	0.70
Ag L	81.47	38.52
Totales	100.00	

**Tabla 10.** Espectro de espectroscopia de energía dispersiva de las AgNP.

### 6.3.2 Concentración de plata en agua y tejido blando

Al momento de la escritura de este manuscrito de tesis se encuentran pendientes los análisis de Ag en agua. La Tabla 11 muestra resultados de la concentración de Ag en el tejido blando que permiten afirmar un aumento luego de la exposición a ambas concentraciones de AgNP.

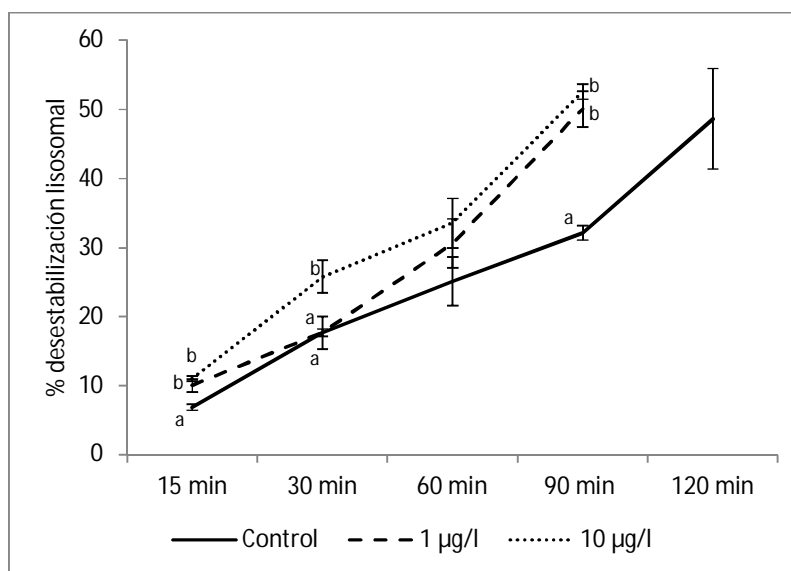
Tratamiento	mg Ag/kg tejido húmedo
Control	0.055 ± 0.020
1 µg L <sup>-1</sup>	0.488 ± 0.057
10 µg L <sup>-1</sup>	4.933 ± 0.903

**Tabla 11.** Resultados preliminares de concentración de plata en tejido blando de *Mytilus galloprovincialis* expuestos a 1 y 10 µg AgNP L<sup>-1</sup> durante 96 h. Los valores se expresan como medias ± DE.



### 6.3.3 Desestabilización de la membrana lisosomal

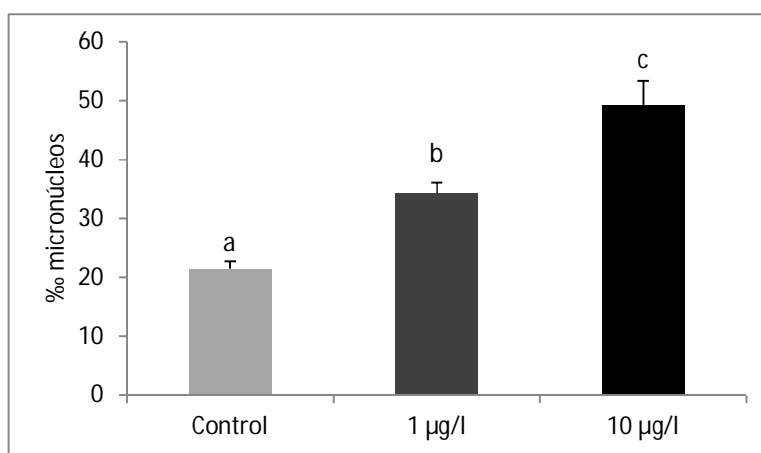
La destabilización de la membrana lisosomal (DML) se evaluó en los hemocitos de los moluscos a diferentes intervalos de tiempo. Los resultados se muestran en la Figura 20 (los datos se expresan como % de desestabilización de los lisosomas en 5 tiempos diferentes). Luego de la exposición a ambas concentraciones de AgNP (1 y 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), el 50% de los hemocitos presentó DML a los 90 min, mientras que aquellos pertenecientes al grupo control, dicho porcentaje se alcanzó a los 120 min. Pasados 15 y 90 min, en el caso de ambas concentraciones de AgNP, la cantidad de hemocitos con DML aumentó significativamente ( $p_{15 \text{ min}}=0.0071$ ,  $p_{90 \text{ min}}<0.0001$ ). Luego de 30 min, también la cantidad se aumentó en el caso de la mayor concentración de AgNP ( $p=0.0014$ ).



**Figura 20.** Porcentajes de hemocitos con DML en función del tiempo de *Mytilus galloprovincialis* expuestos a 1 y 10  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  durante 96 h. Los valores se expresan como medias  $\pm$  DE. Las medias que no comparten el mismo suscripto (a o b) en cada columna son significativamente diferentes a  $p<0.05$ .

#### 6.3.4 Test de micronúcleos

La frecuencia de micronúcleos (MN) en los hemocitos de los moluscos está resumida en la Figura 21. Se evidenció un aumento significativo luego de la exposición a ambas concentraciones de AgNP ( $p < 0.0001$ ).



**Figura 21.** Porcentajes de MN en hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* expuestos a 1 y 10 µg AgNP L<sup>-1</sup> durante 96 h. Los valores se expresan como medias ± DE. Las medias que no comparten el mismo suscripto (a, b o c) en cada columna son significativamente diferentes a  $p < 0.05$ .

#### 6.3.5 Estrés oxidativo

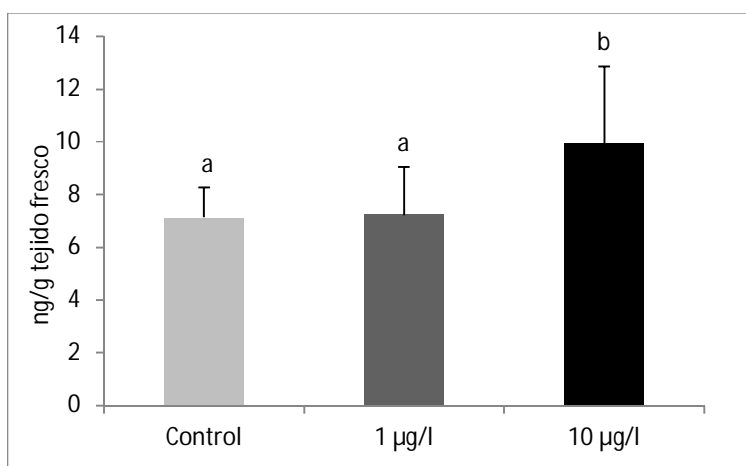
Los parámetros de estrés oxidativo medidos en la glándula digestiva de los moluscos se muestran en la Tabla 12. Se evidenció un aumento de la enzima antioxidante GST en el caso de la exposición a 10 µg AgNP L<sup>-1</sup> ( $p = 0.0047$ ). En cuanto a CAT, no se evidenciaron cambios significativos. Los niveles de LPO aumentaron en el caso de la mayor concentración ( $p = 0.0047$ ).

Tratamiento	CAT	GST	LPO
Control	4.63 ± 0.78	22.51 ± 1.43 <sup>a</sup>	21627.41 ± 955.17 <sup>a</sup>
1 µg L <sup>-1</sup>	5.20 ± 0.17	24.32 ± 2.26 <sup>ab</sup>	23784.02 ± 1992.40 <sup>a</sup>
10 µg L <sup>-1</sup>	4.72 ± 0.44	27.56 ± 3.04 <sup>b</sup>	32809.69 ± 3388.17 <sup>b</sup>

**Tabla 12.** Actividades de las enzimas CAT y GST, y niveles de LPO en la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis* expuestos a 1 y 10 µg AgNP L<sup>-1</sup> durante 96 h. Las actividades enzimáticas expresadas en µmol min<sup>-1</sup> mg prot<sup>-1</sup>, y LPO: nmol MDA mg prot<sup>-1</sup>. Los valores se expresan como medias ± DE. Las medias que no comparten el mismo suscripto (a o b) en cada columna son significativamente diferentes a p<0.05.

### 6.3.6 Metalotioneínas

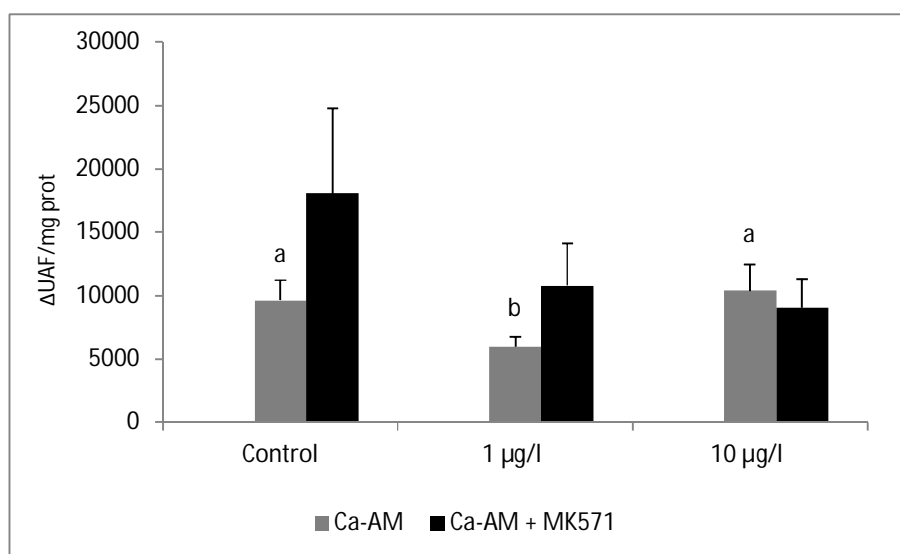
Como se muestra en la Figura 22, se evidenció inducción de metalotioneínas (MT) en el caso de las glándulas digestivas de los moluscos expuestos a 10 µg AgNP L<sup>-1</sup> (p=0.0463).



**Figura 22.** Inducción de MT en la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis* expuestos a 1 y 10 µg AgNP L<sup>-1</sup> durante 96 h. Los valores se expresan como medias ± DE. Las medias que no comparten el mismo suscripto (a o b) en cada columna son significativamente diferentes a p<0.05.

### 6.3.7 Actividad de transportadores de membrana

La actividad de los transportadores de membrana en las branquias de los moluscos se muestra en la Figura 23. Luego de la exposición a  $1 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$ , hubo una disminución estadísticamente significativa de la actividad ( $p=0.0134$ ).



**Figura 23.** Actividad mediada por los transportes de membrana en branquias de *Mytilus galloprovincialis* expuestos a 1 y 10  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  durante 96 h. Los valores se expresan como medias  $\pm$  DE. Las medias que no comparten el mismo suscripto (a o b) en cada columna son significativamente diferentes a  $p < 0.05$ .

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Ensayos *in vivo* con *Prochilodus lineatus*

#### 7.1.1 Caracterización de las AgNP

Las nanopartículas de plata utilizadas en este estudio resultaron ser de forma esférica con un tamaño de partícula de aproximadamente 29 nm, según los resultados arrojados por SEM y TEM. Este tamaño de partícula coincide con lo descrito por los fabricantes. Adicionalmente, las AgNP fueron altamente estables y sólo una pequeña cantidad de iones  $\text{Ag}^+$  fue liberada al medio acuoso (8%), hecho que se le atribuye a la presencia de polivinilpirrolidona (PVP) como un agente estabilizante eficiente. De hecho, la liberación de iones alcanzó el equilibrio a las 24 h.

Es importante tener en cuenta que las AgNP de diferentes tamaños y agentes estabilizantes ejercen distintos grados de toxicidad en los organismos test, según el tiempo y las condiciones de exposición [231]. La exposición de *Oncorhynchus mykiss* a diferentes tamaños de AgNP mostró que las NP más pequeñas (10 nm) eran más fácilmente bioacumulables en los tejidos [104]. Sin embargo, Mehennaoui et al. [48] no hallaron una correlación positiva entre los niveles de acumulación de AgNP y el tamaño de partícula (20, 40 ó 80 nm) en el crustáceo *Gammarus fossarum*; pero sí, según el coadyuvante. Las AgNP con coadyuvante o capping de citrato fueron mayormente absorbidas que aquellas de polietilenglicol. Este último, al ser un compuesto orgánico (como ocurre en la mayoría de las AgNP comerciales), les otorgaría más estabilidad a las NP al prevenir más eficientemente la interacción con el medio que las rodea, por lo tanto evitaría o reduciría su aglomeración. Esta línea de investigación debe seguir estudiándose cuidadosamente para entender más acerca de este problema y preocupación respecto a los riesgos ambientales que conllevan las NP y su toxicidad relacionada al tamaño “nano”, el coadyuvante utilizado y las propiedades intrínsecas [66].

En el presente trabajo, la medición de la plata total en el medio de exposición no mostró diferencias significativas en 48 h (tiempo de renovación de tratamientos) en

comparación a las concentraciones nominales de AgNP (2.5 y 25  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). En este sentido, las concentraciones de Ag en agua representaron el 95-100% de las nominales. Estos resultados coinciden con Ribeiro et al. [66], quienes describieron a las AgNP como razonablemente estables luego de dos semanas, dado que registraron el 91% de las concentraciones nominales. Por el contrario, otros autores registraron el 40-50% de las concentraciones nominales luego de diferentes tiempos de exposición [104] [108] [169]. Esta variabilidad podría deberse a que el estado de agregación y disolución de las AgNP en medios ambientales y biológicos dependen de cómo las NP estén preparadas, el tipo de coating utilizado y las condiciones del medio de dispersión [80]. Por lo tanto, es esperable que se obtengan diferentes resultados entre los estudios llevados a cabo con diferentes AgNP y condiciones experimentales.

#### 7.1.2 Concentración de plata en agua y tejido

Respecto a los niveles de Ag hallados en los tejidos de los peces, la mayor bioacumulación ocurrió en el hígado, seguido por las branquias, intestino y por último el cerebro de los peces (hígado>branquias>intestino>cerebro), en el caso de la exposición a 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  durante 15 días. El hígado fue el órgano con mayor bioacumulación de Ag, lo cual coincide con lo reportado por varios autores. En ejemplares de trucha arcoíris expuestos por 10 días a AgNP, los niveles de Ag en hígado superaron varias veces los de branquias y riñón, independientemente del tipo de coating que tenían las nanopartículas (citrato o PVP) [104]. También en el pez medaka (*Oryzias latipes*) se analizó la acumulación de Ag en varios tejidos (hígado, vesícula, corazón, bazo, cerebro, riñón, intestino, branquias, carcasa) luego de condiciones subcrónicas de exposición a AgNP, y el hígado resultó el órgano con mayores niveles de Ag (aproximadamente diez veces mayores que en los demás tejidos) [105], [233]. Handy et al. [234] explican que los metales se depositan en el hígado de los peces en forma de gránulos, por lo que las AgNP también podrían quedar depositadas y así el tejido alcanzaría altos niveles de concentración de Ag. Panyala et al. [94] sugieren que toda forma química de Ag se distribuye a través del sistema circulatorio y principalmente se acumula en el hígado. Entonces, el intercambio de

xenobióticos entre las células sanguíneas y los hepatocitos es maximizado, lo que convierte al hígado en el primer órgano blanco para muchos tóxicos [112].

En las branquias de los peces se evidenció un aumento de los niveles de Ag luego de ambas concentraciones de nanoplata. Este órgano está particularmente afectado por los xenobióticos dado que es uno de los tejidos con mayor contacto con el medio de exposición y con un importante flujo sanguíneo [235]. Se han encontrado altos niveles de Ag en branquias de *Danio rerio* y *Salmo salar* expuestos a AgNP por tiempos de exposición cortos [101], [108], [144]. Wu & Zhou [105] analizaron un aumento en los niveles de Ag en branquias de *Oryzias latipes* después de una exposición a 0.24 mg AgNP L<sup>-1</sup> por 14 días. Sin embargo, las concentraciones utilizadas en el presente estudio (2.5 y 25 µg AgNP L<sup>-1</sup>) son considerablemente menores, y resulta destacable que luego de la exposición a estas bajas concentraciones de AgNP, la Ag se acumuló ampliamente en las branquias.

Las NP podrían quedar atrapadas en la capa de mucus de las branquias o ser absorbidas por el epitelio branquial. A su vez, la capa de mucus que rodea al epitelio puede actuar como una barrera y reducir la absorción de las NP en las branquias [17]. En este estudio, la mayor concentración de Ag fue medida luego de la exposición a la mayor concentración y tiempo (25 µg AgNP L<sup>-1</sup> durante 15 días), y al mismo tiempo se observó una mayor proliferación de células de mucus. Por lo tanto, en futuros estudios sería pertinente cuantificar en forma separada la concentración de Ag acumulada en el tejido y aquella atrapada en la capa mucosa.

Otros tejidos acumularon Ag en proporciones menores. La concentración de Ag en el intestino de los peces fue cuatro veces menor que la del hígado. En la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) expuesta a AgNP coloidal y sólida (0.1-1 mg L<sup>-1</sup>) por 21 días se encontró un aumento en la acumulación de Ag en hígado, branquias e intestino [236]. Los autores explicaron que la cantidad de agua bebida por el pez de agua dulce podría aumentar varias veces en situaciones de estrés, por lo que el tracto gastrointestinal sería una de las principales vías de entrada. Sin embargo, existen controversias acerca de cuál es la principal ruta de entrada de las AgNP. Gaiser et al. [237] estudiaron la absorción potencial de las NP por la vía del tracto gastrointestinal, y determinaron que

la ingestión es una ruta viable para la absorción de Ag por parte de diferentes células epiteliales. Es decir que, la entrada de las AgNP en los peces puede haber ocurrido por el tracto gastrointestinal (por el consumo de material aglomerado de NP junto con el alimento o el agua bebida), a través de las branquias, o por ambas vías. Bergin & Witzmann [238] trabajaron con mamíferos y mostraron que las NP grandes permanecen en la mucosa del tracto gastrointestinal, mientras que las más pequeñas ingresan al torrente sanguíneo y se acumulan en órganos blanco donde causan efectos deletéreos.

En el presente estudio se observó un aumento de los niveles de Ag en el cerebro de los peces en el caso de la mayor concentración de AgNP ( $25 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y tiempo de exposición (15 días). En el cerebro de *Piaractus mesopotamicus*, luego de ser expuesto a 10 y  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  de la misma marca de AgNP utilizada en este estudio, se observó un aumento de la acumulación de Ag [169]. Pretto et al. [236] hallaron altos niveles de cadmio en el cerebro de *Rhamdia quelen* y explicaron que cuando ocurre la saturación de la capacidad de almacenamiento por parte del hígado, se estimula el almacenamiento de los metales en otros órganos. La presencia de Ag en el cerebro puede generar daños neurológicos en los peces, como alteraciones en el desarrollo embrionario y en el comportamiento de las larvas [240].

### 7.1.3 Parámetros morfométricos y hematológicos

El índice hepatosomático (IHS) representa una medida del estado de crecimiento del hígado y de las reservas energéticas [241]. Por su parte, el factor de condición (FC) brinda una visión general del estado de salud de pez [242]. En el presente estudio no se detectaron diferencias respecto al FC, mientras que el IHS aumentó pasados ambos tiempos de exposición (5 y 15 días) en el caso de la mayor concentración de AgNP ( $25 \mu\text{g L}^{-1}$ ). En la misma línea, juveniles de trucha arcoíris expuestos a 0.28 y  $47.60 \text{ mg AgNP L}^{-1}$  (en promedio) durante 28 días no mostraron diferencias en el FC [242]. Sin embargo, no se ha podido establecer un patrón respecto a la respuesta del IHS según los diferentes estudios: en la trucha arcoíris expuesta a  $32\text{-}32.000 \text{ mg AgNP L}^{-1}$  el IHS aumentó significativamente [138], mientras que disminuyó cuando los peces fueron



expuesto a 3.000 mg L<sup>-1</sup> por 8 semanas [122]. Considerando las bajas concentraciones de AgNP utilizadas en este estudio, podríamos afirmar que *P. lineatus* es una especie más sensible a esta NP en comparación con la trucha arcoíris.

Son pocos los estudios que consideran análisis hematológicos para estudiar los mecanismos de toxicidad de las AgNP [16]. Shaluei et al. [140] reportaron varios cambios hematológicos en *Hypophthalmichthys molitrix* expuestos a 0.02-0.04 mg AgNP L<sup>-1</sup>, y relacionaron los cambios con una anemia aguda provocada por las AgNP. En nuestro estudio, los valores de GIR y de CMHC aumentaron luego de la exposición a 5 días a 25 µg L<sup>-1</sup>, y sólo la HCM disminuyó en la sangre de *P. lineatus* luego de 15 días. Sin embargo, los resultados no son lo suficientemente robustos como para relacionarlos con una anemia. Los valores recopilados para el sábalo respecto a estas variables indican que están dentro del rango fisiológico normal para la especie [244]. De forma similar, Clark et al. [245] no hallaron resultados consistentes en las células sanguíneas de la trucha arcoíris expuesta a bajas concentraciones de AgNP, y los autores concluyen que las partículas metálicas generan disturbios moderados a estas células que no llegarían a afectar la fisiología normal del pez.

Respecto a los GIB, la cantidad aumentó luego de la exposición a 25 µg L<sup>-1</sup> durante 15 días. Este resultado concuerda con lo hallado por Imani et al. [141], quienes observaron un aumento de GIB en *O. mykiss* expuestos a 0.1-0.4 mg AgNP L<sup>-1</sup> por 8 días. La leucocitosis es una reacción característica en los peces como respuesta a sustancias que alteran sus procesos fisiológicos normales [246]. Las AgNP tienen un efecto estimulante en el sistema inmune inmediato que puede asociarse con una disminución de la respuesta inmunológica no específica [140]. Un aumento de los GIB podría relacionarse con infecciones primarias causadas por tóxicos y con infecciones secundarias contraídas luego de condiciones vulnerables para los peces. Además, linfopenia y monocitosis fueron observados luego de 25 µg AgNP L<sup>-1</sup> durante 15 días. Los linfocitos son las células más importantes en el sistema de respuesta inmune, y su disminución pudo haber sido producto de las condiciones estresantes que generó la presencia de AgNP. Por su parte, los monocitos son macrófagos activos [246], por lo que la monocitosis en los sábalos podría indicar una respuesta para combatir las infecciones primarias y secundarias como los procesos inflamatorios.

#### 7.1.4 Conteo de unidades formadoras de colonias bacterianas

La piel de los teleósteos secreta un mucus que tiene funciones inmunológicas. A pesar de la presencia de factores antimicrobianos, el mucus es colonizado por bacterias que desarrollan un biofilm benéfico para su salud [247], [248]. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron las propiedades bactericidas de las AgNP dado que el número UFC provenientes del mucus aislado de los peces expuestos a AgNP disminuyó significativamente. De manera similar, se ha mostrado que las AgNP alteraron la microbiota intestinal y epidérmica de *Danio rerio* [101], [249] e inhibieron el crecimiento de las bacterias en la superficie corporal del poliqueto *Laeonereis acuta* [180] [250].

Las AgNP tienen el potencial de penetrar las membranas biológicas y llegar a la mayor cantidad de órganos y tejidos diferentes en el cuerpo, donde ejercen sus efectos antibacterianos [50]. Parandhaman et al. [251] estudiaron en detalle los mecanismos bactericidas de partículas compuestas por nanosilica y plata sobre las bacterias gram-negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los autores hallaron un aumento dosis-dependiente en la actividad bactericida de las AgNP (~99% de las bacterias fueron eliminadas ante la exposición a  $1.5 \text{ mg mL}^{-1}$  por 5 h). Si bien sostienen que el debate acerca los mecanismos antibacterianos es complejo, sus resultados afirmaron que la actividad antibacteriana de las AgNP es “partícula-específica” según múltiples pasos: (1) cuando se aproxima a la célula, la unión de la nanopartícula daña la superficie y membrana celular; (2) la desestabilización de las membranas celulares aumenta la permeabilidad, lo que conduce a la fuga de materiales celulares; (3) las AgNP penetran la membrana celular e inactivan la cadena respiratoria de las deshidrogenasas, y consecuentemente alteran la respiración por la fosforilación, y finalmente causan arresto metabólico celular; (4) las AgNP simultáneamente descompensan las membranas celulares a través del alto potencial redox por parte de la plata; (5) las AgNP se unen a las proteínas intracelulares del ADN que están difusas en el citosol, lo que genera daños en el material genético y alteraciones en la regulación de genes de proteínas que codifican para la muerte celular.

Si bien los mecanismos bactericidas por parte de las AgNP se deben en parte a propiedades intrínsecas (que a su vez depende del tamaño, forma, carga superficial y solución química donde se dispersan) cabe destacar que la disolución del ion  $\text{Ag}^+$  es un factor determinante en sus efectos tóxicos [251]. Este ion, independientemente de su fuente de liberación, es uno de los más tóxicos para los organismos acuáticos por alterar mecanismos de osmorregulación [78], [144]. El ion se une a las proteínas superficiales de membrana a través de los grupos sulfhidrilos e inhiben el crecimiento celular [252]. Por último, respecto a los daños a nivel del ADN, la liberación de los iones  $\text{Ag}^+$  permite que éstos se unan al material genético e interaccionen con el fósforo remanente, y así inhiben la replicación [253].

#### 7.1.5 Estrés oxidativo

Las AgNP tienen el potencial de generar estrés oxidativo a través de la producción de sustancias reactivas de oxígeno (ROS) y alteración del sistema de defensa antioxidante [80], [231]. En este estudio, se registró la inducción de todas las enzimas antioxidantes en el hígado de los peces expuestos a  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  por 15 días. Esta activación del sistema de defensa enzimático pudo prevenir el daño oxidativo en el tejido. Govindasamy & Rahuman [119], quienes expusieron *Oreochromis mossambicus* a  $50 \text{ mg AgNP L}^{-1}$  por 8 días, sugieren que el sistema SOD-CAT es la primera línea de defensa contra la toxicidad del oxígeno, lo que revela una estrategia para prevenir el daño oxidativo. De manera contraria, en embriones de *Oryzias latipes* [105] y *Cyprinus carpio* [120], así como en hepatocitos de *Oncorhynchus mykiss* [122] expuestos a AgNP, se observó la inhibición de la actividad de enzimas antioxidantes. Por su parte, la capacidad antioxidante se vio disminuida en el hígado de los peces expuestos a  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  por 15 días. Este resultado indica un aumento de las ROS que el sistema de defensa antioxidante no pudo prevenir, es decir, que la activación del sistema enzimático de defensa antioxidante no fue suficiente para neutralizarlas y evitar su acumulación. Bermejo-Nogales et al. [254] encontraron un aumento de ROS en la línea celular hepática de peces expuestos  $100 \mu\text{g AgNP mL}^{-1}$  y explicaron que las NP alteran la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias y así causan efectos nocivos en

varios niveles a través de la oxidación de los constituyentes celulares, como lípidos, proteínas y ADN.

En las branquias de *Prochilodus lineatus* se observó la inhibición de la actividad de todas las enzimas antioxidantes luego de la exposición a ambas concentraciones de AgNP (2.5 y 25  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) después de 5 días de exposición. Otros autores han reportado resultados similares. En *C. carpio* expuestos a altas concentraciones de AgNP y cortos periodos de exposición, hubo una disminución de la actividad de la enzima GST [120]. En células branquiales de *Labeo rohita* y *Catla catla* expuestas a bajas concentraciones de AgNP por 96 h, se halló inhibición de la actividad de SOD y CAT, y aumento en los niveles de LPO. Además, los niveles de GSH fueron disminuidos, lo que indicaría que el estatus redox de la célula fue alterado, y que las AgNP provocaron estrés y efectos tóxicos dado que el GSH tiene un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis redox [231]. En *Perca flavescens* expuesta a 1 y 100  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  durante 96 h y 10 días, se encontró un aumento en los niveles de LPO que alcanzó el máximo valor luego de 10 días de exposición [106]. Respecto a la capacidad antioxidante, hubo una disminución de la misma en el caso de la exposición a 2.5  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  por 15 días, lo que indica que las nanopartículas perjudicaron la capacidad de las células de neutralizar los radicales. Esto concuerda con el aumento de los niveles LPO, por lo que en estas condiciones de exposición las ROS generaron daño oxidativo en las branquias. Además, el aumento de LPO y disminución de la capacidad antioxidante podrían estar relacionados con la falta de activación del sistema antioxidante por parte de la célula, es decir, los mecanismos detoxificantes fueron inhibidos, por lo que radicales peroxilos se acumularon en la célula y dieron lugar a que ocurra daño oxidativo en lípidos. De manera similar, en embriones del pez cebra expuestos a AgNP se halló un aumento de la producción de ROS, a la vez que hubo una falta de activación del sistema de defensa antioxidante y los niveles de GSH fueron reducidos [255]. La medición de este biomarcador no enzimático podría contribuir a la explicación de los resultados obtenidos en las branquias de *P. lineatus*. A pesar que hay poca información disponible que incluya la medición de los niveles de ACAP, es un biomarcador complementario que ayuda a entender cómo los antioxidantes interactúan con las ROS de manera integradora, en vez de medir un número limitado de antioxidantes [187].

En el caso del intestino de los peces, sólo se evidenció la activación de SOD luego de 5 días de exposición a AgNP, por lo que su sensibilidad a las nanopartículas metálicas resultó ser baja. Sin embargo, Atli et al. [256] consideraron que el intestino es un órgano sensible al daño oxidativo por evidenciar la inhibición de CAT en *O. niloticus* luego de la exposición a 1-1.5 mg Ag<sup>+</sup> L<sup>-1</sup>. Cabe destacar, que el diseño experimental por parte de los autores tuvo en cuenta sólo la toxicidad generada por el ion, y de acuerdo con los resultados obtenidos de la caracterización de AgNP en este estudio, la liberación al medio de estos iones sería muy baja para que ejerza efectos tóxicos consistentes en *P. lineatus*. A su vez, es bien sabido que los daños provocados por el ion Ag<sup>+</sup> difieren de aquellos provocados por las AgNP. A pesar que la toxicidad de las NP metálicas se relacione con la liberación del ion, todavía es incierto cómo y en qué medida su liberación influye en la toxicidad de las AgNP [257].

Por último, se evidenció el aumento de las actividades enzimáticas de SOD y GST en el cerebro de *P. lineatus* luego de la exposición a 25 µg AgNP L<sup>-1</sup> por 15 días. El cerebro es susceptible al daño oxidativo por parte de los radicales libres dado que no sólo contiene gran cantidad de lípidos insaturados, sino que también utiliza el 20% de la demanda de oxígeno de todo el cuerpo. Además, este órgano cuenta con un sistema de defensa antioxidante débil [113]. Según Atli et al. [256], la inducción de la actividad de CAT podría asociarse con un sistema de defensa antioxidante efectivo que compensa la inhibición (o falta de activación) de otras enzimas. A pesar que la actividad de CAT en cerebro de *P. lineatus* expuestos a AgNP no difirió de los del grupo control, se registró la activación de las enzimas SOD y GST, lo que pudo ser suficiente para prevenir el daño oxidativo. En los cerebros de *Piaractus mesopotamicus* expuestos a la misma marca de AgNP utilizada en este estudio (10 y 25 µg L<sup>-1</sup>) por 24 h no se hallaron diferencias respecto a las actividades enzimáticas antioxidantes, aunque los niveles de LPO sí se vieron aumentados [169]. En los cerebros de *C. carpio* expuestos a AgNP durante 48 y 96 h, tampoco se observó activación del sistema de defensa antioxidante [120]. Sin embargo, la exposición de 15 días llevada a cabo en este estudio podría ser una mejor aproximación a los escenarios reales, y la activación de las enzimas antioxidantes podrían revelar una señal temprana de defensa que evite daño neurológico.

### 7.1.6 Metabolitos plasmáticos y reservas energéticas

Todos los metabolitos plasmáticos de los peces aumentaron luego de 5 días de exposición a  $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$ , y sólo los triglicéridos (Trig) permanecieron elevados luego de la exposición subcrónica. El aumento de los niveles de todos los metabolitos plasmáticos sugiere un aumento de fuentes de energía disponibles para que el pez utilice en situaciones de emergencia [145]. Bajo condiciones de estrés, ocurren respuestas primarias y secundarias. La liberación de hormonas de estrés como el cortisol al torrente sanguíneo genera cambios químicos en la sangre y tejido del pez [258]. Esta respuesta primaria moviliza y eleva la producción de glucosa, que es mayormente mediada en simultáneo por las vías gluconeogénesis en el hígado y la glucogenólisis en el hígado y músculo [142], [143]. Varios investigadores han reportado altos niveles de cortisol plasmático en peces como respuesta a la exposición de AgNP [240], [242], [259]. A pesar que en este estudio no se midieron los niveles de cortisol, se observó un aumento de glucemia en el caso de los peces expuestos a  $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  durante 5 días. Este resultado no fue acompañado por cambios en los niveles de glucógeno muscular. Entonces, las vías de gluconeogénesis y glucogenólisis en el hígado serían las responsables del aumento de los niveles de glucosa plasmática. Desafortunadamente, los niveles de glucógeno en hígado no pudieron determinarse a los 5 días de exposición a AgNP. De manera similar, Farmen et al. [144] observaron un aumento de glucosa plasmática en *Salmo salar* expuestos a  $100 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  durante 48 h, y Shalvei et al. [140] encontraron un aumento en la glucemia de *H. molitrix* expuestos a  $10 \mu\text{g AgNP mL}^{-1}$ . Massarsky et al. [139] hallaron un aumento en la glucogenólisis cuando expusieron hepatocitos de la trucha arcoíris a 0.01, 0.02 y 0.04 mg AgNP L<sup>-1</sup> durante 3 y 7 días. Esta estimulación fue independiente del receptor y sugiere que las AgNP afectan las vías de señales celulares para la regulación de hormonas. En el presente estudio, se evidenció un aumento en los niveles de glucógeno en el hígado y músculo de *P. lineatus* luego de la exposición a  $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  durante 15 días. Este contraste de resultados se podría explicar por las diferencias en las condiciones experimentales y concentraciones de AgNP. Es importante resaltar que el aumento en el contenido de glucógeno puede incrementar la masa húmeda del tejido a causa de la incorporación de agua dentro del complejo del glucógeno [243].

Esto podría explicar el aumento en el IHS en el caso de los peces expuestos a 25  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$ .

En el plasma de los peces expuestos a la mayor concentración de AgNP (25  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) por 5 días se evidenció un aumento en los niveles de proteínas, lo que sugiere la presencia de procesos inflamatorios. Las AgNP pueden ingresar a las células de diferentes tejidos, generar ROS y finalmente inflamación [134], [260]. Este resultado es consistente con el aumento de monocitos en la sangre de los peces y con la alteración de marcadores de estrés oxidativo en los órganos. Otros autores también encontraron cambios en los niveles de proteínas plasmáticos luego de la exposición a AgNP. Vignesh et al. [257] reportaron un aumento de la concentración de proteínas en el suero de *Labeo rohita* expuestos a 50  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  por 21 días. Contrariamente, Monfared et al. [261] observaron una disminución en las proteínas totales en el suero de *O. mykiss* expuestos a altas concentraciones de AgNP (3-1000  $\text{mg L}^{-1}$ ) por 8 semanas. Las discrepancias entre los resultados pueden ser atribuidas a varios factores como las concentraciones de AgNP, tiempos de exposición y diferencias interespecíficas. En el músculo de *P. lineatus* expuestos a 25  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  por 15 días, el uso espontáneo de aminoácidos utilizados en reacciones catabólicas podría explicar la disminución del contenido proteico para aliviar el estrés [257]. Los niveles de proteínas dependen de la dinámica del equilibrio entre su síntesis y su tasa de degradación. Un nivel de cortisol alto a causa de condiciones de estrés aumenta la proteólisis en los miocitos [262]. Además, los niveles de proteína hepática mostraron una tendencia a disminuir luego de ambos periodos de exposición a AgNP (5 y 15 días). El catabolismo de proteínas libera aminoácidos, los cuales son considerados uno de los principales precursores gluconeogénicos en mamíferos y peces [263]. Tanto la disminución de proteínas en músculo como el aumento de aminoácidos en plasma, podrían haber aumentado la gluconeogénesis y la síntesis de glucógeno en el hígado. En este estudio observamos un aumento en los niveles de glucógeno y un leve aumento en la glucosa plasmática de los peces expuestos a 25  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  por 15 días. Otros metales como el cadmio también generan una fuerte proteólisis que resulta en una disminución de los niveles de proteína en músculo [263].

La hipertrigliceridemia observada en peces expuestos a  $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  por 15 días estuvo acompañada de niveles normales de lípidos en hígado y músculo. El contenido de triglicéridos plasmáticos es el resultado de un equilibrio entre la secreción hepática y su remoción por parte de los diferentes tejidos periféricos, sin embargo, más análisis son necesarios para entender los efectos de la AgNP sobre dichos procesos metabólicos.

### 7.1.7 Análisis histológicos en branquias

El índice del órgano (índice de branquias,  $I_{br}$ ) aumentó en el caso de los peces expuestos a  $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  por 15 días. Bernet et al. [202] consideraron de gran importancia el valor de este índice, dado que un aumento representa un alto grado de daño en el órgano. Las histopatologías en branquias halladas en el presente estudio concuerdan con la manifestación de otros biomarcadores como el aumento de los niveles de Ag en tejido y de LPO. Principalmente el aumento del  $I_{br}$  se relaciona con la frecuencia de las fusiones e hipertrofias observadas en las branquias de los peces expuestos a AgNP. Schlenk & Benson [264] resaltaron la importancia de las branquias como órgano blanco para compuestos tóxicos dado que exhiben una larga superficie que está en contacto directo con potenciales irritantes de manera constante. Similarmente, también se ha reportado daño histológico (congestión leve de los vasos sanguíneos, fusiones e hiperplasias) en las branquias de *Oreochromis mossambicus* expuestos a altas concentraciones de AgNP ( $25, 50$  y  $75 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 8 días [119].

Las branquias poseen células mucosas localizadas en la capa epidérmica de la piel que cumplen varias funciones protectoras como la excreción de sustancias de desecho, resistencia contra enfermedades y comunicación [265]. Luego de 15 días de exposición a ambas concentraciones de AgNP, la cantidad de células mucosas (CM) aumentó significativamente en los filamentos branquiales de *P. lineatus*. Este resultado concuerda con Lee et al. [120], quienes expusieron a *C. carpio* a  $50$  y  $100 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  y detectaron un aumento de células mucosas (CM) luego de  $40$  y  $96$  h. Los autores explicaron que un aumento en el número de CM es una respuesta corporal necesaria en el pez para contraatacar los efectos nocivos de químicos exógenos, como en este



caso, las AgNP. Entonces, consideramos valiosa la sensibilidad de este biomarcador en condiciones de exposiciones cortas como subcrónicas a un amplio rango de concentraciones de AgNP. Por su parte, Shephard [266] investigó acerca del mucus de los peces y concluyó que es tarea difícil el determinar el estado de las capas mucosas en peces con buen estado de salud y sin condiciones de estrés que lo alteren, sobre todo en las branquias. El autor explicó que el mucus protege la superficie de las branquias de la abrasión provocada por la materia particulada en el agua. Además, reportó varios casos en donde hubo aumento de CM en peces estresados por la exposición a pH bajos, condiciones ambientales ácidas y la presencia de metales pesados y esenciales. La capa de mucus podría ser un efectivo medio de crecimiento para parásitos y esporas fúngicas. Además, cuando el espesor de la capa de mucus aumenta, podría acarrear una demanda extra de oxígeno que da lugar a un estrés respiratorio. El conteo de CM resultó un biomarcador sensible y ha sido utilizado para reportar daños provocados por otros tipos de contaminantes como metales, organoclorados y herbicidas [204], [267].

#### 7.1.8 Enzimas transaminasas en branquias

En el caso de las branquias de los peces expuestos a  $2.5 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  la actividad de la enzima ALT se vio inhibida, mientras que la de la enzima AST aumentó luego de la exposición a  $25 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  pasados los 15 días de exposición. De Smet & Blust [268] explicaron que altos niveles de transaminasas en las branquias de peces están asociados a un aumento de la descomposición de proteínas, lo que sugiere una respuesta funcional para compensar los gastos energéticos extras en situaciones de estrés. Experiencias reportadas con *D. rerio* y *C. carpio* expuestos a diferentes tipos de contaminantes demostraron un aumento en la actividad de ambas enzimas (AST y ALT), lo cual fue asociado con daños a nivel funcional y estructural de las branquias [269], [270].

Se ha reportado que la inhibición de las enzimas aminotransferasas en el hígado de peces expuestos a cadmio podría deberse a la interacción del metal con la biosíntesis

del piridoxal fosfato, una molécula esencial para el normal funcionamiento de las enzimas. Además, cuando un metal se encuentra en concentraciones elevadas, la actividad de las enzimas aumenta para contrarrestar la crisis energética ante la situación de estrés [271]. Esto podría explicar la inhibición de la actividad de ALT en el caso de la exposición a la menor concentración de AgNP, y la inducción de AST luego de la mayor concentración. Los resultados obtenidos en el presente estudio sostienen que los cambios en las actividades de las aminotransferasas acompañan y se relacionan con las alteraciones histológicas en las branquias, por lo que son parámetros importantes para evaluar las respuestas de los peces ante la exposición de sustancias tóxicas.

#### 7.1.9 Análisis multivariado

Dado que un solo biomarcador no es suficiente para reflejar el estado de salud de un organismo, es recomendable aplicar una batería de biomarcadores cuando se intenta explicar los efectos tóxicos de los xenobióticos [272]. Con el fin de integrar los resultados obtenidos de acumulación y las respuestas biológicas, se llevó a cabo un análisis multivariado (análisis de componentes principales, ACP). De acuerdo con este análisis, el componente principal 1 (CP1) separó claramente los peces expuestos a 25  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  por 15 días de los demás tratamientos. Este agrupamiento fue principalmente definido por: IHS, parámetros hematológicos, alteraciones de reservas energéticas en el músculo, biomarcadores de estrés oxidativo y acumulación de Ag en hígado y cerebro. El segundo componente principal (CP2) separó a los peces expuestos a diferentes tiempos de exposición (5 y 15 días), donde las variables significativas fueron: estrés oxidativo y acumulación de Ag en branquias, triglicéridos en plasma, costo energético en músculo, parámetros hematológicos, y LPO y GST en hígado.

Claramente, la exposición de 15 días a AgNP reveló un perfil fisiológico diferente en los peces, la cual se acerca a escenarios ambientales más realistas (bajas concentraciones, exposiciones crónicas). A pesar que biomarcadores como los de estrés oxidativo son los más utilizados para demostrar los efectos de estas nanopartículas metálicas, el ACP

reveló que también existen otros parámetros importantes, como los hematológicos y las reservas energéticas, que contribuyen a entender los mecanismos de toxicidad.

Por otro lado, es de destacar al hígado y a las branquias como órganos blanco para explicar la variabilidad de las respuestas a los diferentes tiempos de exposición. Los cambios más importantes en el hígado se manifestaron luego de 15 días, mientras que en el caso de las branquias lo hicieron a los 5 días de exposición. Esto demuestra la importancia y complementariedad de utilizar una batería de biomarcadores en diferentes tejidos, cuyas respuestas permitan entender los efectos a diferentes tiempos de exposición.

Por su parte, el cerebro y los marcadores de estrés oxidativo también tuvieron una notable influencia para definir la separación del CP1, mientras que cuando se analizan los biomarcadores individualmente, este órgano no parecería ser particularmente sensible a los efectos de las AgNP. A raíz de esta visión holística de los resultados, creemos que es valioso el aporte de biomarcadores que no son utilizados frecuentemente para describir los efectos tóxicos de las AgNP (estos son: respuestas inmunológicas, hematológicas y de costo energético). En resumen, este enfoque multivariado brindó un análisis global de las respuestas que resultaron clave para contribuir en el mejor entendimiento de la toxicidad que provocan las AgNP en los peces.

## 7.2 Ensayos *ex vivo* con branquias de *Piaractus mesopotamicus* y *Corydoras paleatus*

En la bibliografía existe controversia sobre si la toxicidad generada por la exposición a las AgNP se explica por las propiedades intrínsecas del tamaño “nano” o por las iónicas (liberación del ion  $\text{Ag}^+$ ) [80]. Para vislumbrar esta incertidumbre, muchos estudios han incluido en sus diseños experimentales tratamientos tanto con AgNP como con el metal disuelto (utilizando en general el nitrato de plata,  $\text{AgNO}_3$ ). Según algunos autores, los efectos tóxicos provocados por los nanometales no serían tan severos como los generados por la disolución de los iones [16], [273]. La toxicidad directa de las AgNP sobre los organismos se relacionaría con la producción de ROS, daños de membranas, desnaturalización de proteínas, daño en el ADN y generación de radicales libres; mientras que sus efectos indirectos se asociarían con la liberación constante del ion  $\text{Ag}^+$  cuando las AgNP entran en suspensión, el cual efectivamente es el responsable de causar los efectos tóxicos “reales” [273]. Sin embargo, otros estudios han demostrado efectos disímiles cuando se compara la toxicidad de AgNP con  $\text{AgNO}_3$  [66], [106], [122], [231], [134]. Según Wood et al. [274], los efectos tóxicos generados por los iones  $\text{Ag}^+$  en *Oncorhynchus mykiss* se deben principalmente a que interactúan con la superficie de las branquias y no por su capacidad de bioacumularse, a diferencia de las AgNP. En este sentido, el tamaño “nano” ha sido asociado a patologías inusuales, como las neurológicas [16], [240].

En el presente estudio, la exposición a AgNP, al igual que a  $\text{AgNO}_3$ , provocó un aumento de la actividad de la enzima CAT en las branquias de *Piaractus mesopotamicus*. La enzima CAT es una de las principales líneas de defensa antioxidante contra la toxicidad del oxígeno al eliminar las ROS y evitar su acumulación en los tejidos [119]. Su principal función es catalizar la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  [120], por lo que su inducción es clave para prevenir el daño oxidativo [275].

Por el contrario, en las branquias de *Corydoras paleatus* expuestas a ambos tratamientos (AgNP y  $\text{AgNO}_3$ ) se mostraron diferentes efectos: las AgNP generaron daño oxidativo en lípidos (sin alteración de las defensas antioxidantes), mientras que la  $\text{AgNO}_3$  disminuyó la actividad de GST y los niveles de GSH. En concordancia con estos

resultados, un aumento del daño oxidativo fue registrado en eritrocitos y hepatocitos de la trucha arcoíris expuestos *in vitro* a AgNP, pero no en el caso de la exposición a AgNO<sub>3</sub> [122]. Según los autores, esto podría deberse a que las AgNP generan ROS extracelulares y/o en las proximidades de las membranas. Un ensayo *in vivo* con perca amarilla (*Perca flavescens*) reveló un aumento de los niveles de LPO en las branquias de los peces expuestos a 100 µg L<sup>-1</sup> de AgNP y AgNO<sub>3</sub> por 96 h y 10 días. Este daño revela una grave disfunción celular y falta de efectividad por parte del sistema de defensa antioxidante para mitigar el estrés oxidativo generado por ambas formas de Ag [106].

La disminución de los niveles de GSH hallada en las branquias del quitasueños expuestas a la sal de plata coincide con otros resultados obtenidos en líneas celulares branquiales y eritrocitos de peces expuestos a AgNP y AgNO<sub>3</sub> [122], [231]. El GSH es una sustancia crítica para el mantenimiento de la homeostasis celular dado que protege la célula de oxidantes endógenos y exógenos. Por lo tanto, un agotamiento del mismo altera el estado redox celular y genera una situación de estrés [231]. Por otro lado, el agotamiento del GSH puede relacionarse con la gran afinidad de los iones Ag<sup>+</sup> libres para unirse con los grupos tiol, o al aumento drástico de su demanda para ser transportado por fuera de la célula y ser degradado por glutamil-transferasas y peptidasas en respuesta al estrés generado por el xenobiótico, entre otras actividades celulares que requieren a la sustancia como antioxidante [122]. Un agotamiento de los niveles de GSH puede relacionarse con la inhibición de enzimas antioxidantes que lo utilizan como sustrato [106], como ocurrió en el caso de la GST en las branquias de *C. paleatus* expuestas a AgNO<sub>3</sub>. En consistencia con estos resultados, Massarsky et al. [122] también hallaron inhibición de la actividad enzimática de GST y lo atribuyen al agotamiento del GSH, dado que éste conjuga productos dañinos resultantes de la LPO.

Teniendo en cuenta que la toxicidad de las nanopartículas puede verse influenciada por las características del medio, en el presente estudio se planteó evaluar los efectos de la presencia de uno de los factores que podrían modular su toxicidad (ácidos húmicos, AH). La materia orgánica natural tiene un importante rol en el destino y transporte de muchos tipos de xenobióticos en los ambientes acuáticos [276]. Por ejemplo, son capaces de afectar el potencial de movilización de metales pesados y

arsénico, promover la sorción de los metales traza, y favorecer la sorción/desorción de contaminantes orgánicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos [277], [278], [279], [280]. Particularmente, las sustancias húmicas (SH) son compuestos omnipresentes en los ambientes naturales, dado que constituyen el componente principal del humus y la materia orgánica del suelo. Entre ellas, los AH corresponden a la fracción de las SH no soluble en medios ácidos ( $\text{pH} < 2$ ), pero sí solubles a pH mayores [86]. Cuando los organismos acuáticos absorben las SH del medio circundante, dado que se tratan de sustratos no endógenos, sus sistemas intentan eliminarlas a través de las mismas reacciones que actúan en caso de contaminantes (inducción del sistema de defensa antioxidante, inducción y modulación de enzimas de biotransformación). Entonces, esto supondría un consumo de energía extra que perjudicaría a los mismos [281]. Sin embargo, este paradigma puede ser contradictorio en ciertos contextos. Se ha demostrado que la presencia de SH mejora la salud de los peces en condiciones adversas, como pH bajos y altas concentraciones de calcio al interactuar con el epitelio branquial, lo que les proporcionaría mayor protección del medio circundante [282].

En el presente estudio, el tratamiento control+AH no mostró respuestas estadísticamente significativas con respecto al grupo control de solución salina; pero sí se observó que todos los efectos registrados en las branquias expuestas a AgNP y  $\text{AgNO}_3$  fueron mitigados cuando los AH se encontraban en el medio. Los resultados podrían explicarse teniendo en cuenta que las AgNP se aglomeran naturalmente con otras sustancias, como cuando interactúan con los materiales orgánicos naturales como los AH. Estas agregaciones contribuyen a la sedimentación y reducción de la movilidad de las AgNP en los ambientes, con la consecuente disminución de la biodisponibilidad y efectos tóxicos en los organismos acuáticos [81], [87], [120]. Los efectos mitigantes de los AH sobre la toxicidad de las AgNP también fueron observados en otros organismos acuáticos. Ejemplares de *Ceriodaphnia dubia* expuestos a  $50 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  evidenciaron un aumento de la supervivencia cuando los AH estaban presentes en el medio acuoso ( $20\text{-}80 \text{ mg L}^{-1}$ ) [89]. Similarmente, la mortalidad de embriones de *Oryzias latipes* expuestos a AgNP por 96 h disminuyó en presencia de SH

debido a la formación de complejos con los iones  $\text{Ag}^+$ , lo cual reduce su biodisponibilidad [284].

Hasta la fecha, en lo que a nosotros concierne, este estudio es el primero en evaluar los mecanismos de toxicidad de las AgNP luego de exposiciones *ex vivo* de branquias. Este ensayo rápido permitió, por un lado, demostrar diferencias en la sensibilidad entre especies, donde *C. paleatus* resultó más sensible que *P. mesopotamicus*. Por otra parte, el estudio mostró que los efectos fueron similares (pacú) o diferentes (quitasueños) cuando se compararon las AgNP y la sal de plata. Es bien conocido que la sensibilidad de los organismos a un mismo compuesto tóxico puede variar inter o intraespecíficamente y generar diferentes respuestas según el organismo test estudiado. Cuando *Danio rerio*, *Daphnia magna* y *Pseudokirchneriella subcapitata* fueron expuestos a AgNP y la sal de plata, claramente revelaron efectos tóxicos diferentes [66]. En el caso del pez cebra, los efectos más severos se observaron en el caso de la exposición a  $\text{AgNO}_3$ , que produjo un retraso en la eclosión de huevos. Respecto al alga, se hallaron resultados similares dado que su tasa de crecimiento fue inhibida luego de la exposición a ambas sustancias. Por su parte, el microcrustáceo mostró diferentes efectos tóxicos según la presencia de alimento en el medio (que formaría aglomerados con las AgNP y disminuiría su biodisponibilidad) [66]. Por último, los resultados arrojados por este estudio demostraron claramente los efectos de mitigación de las SH sobre la toxicidad de las AgNP o  $\text{AgNO}_3$ , lo cual permite una evaluación de un escenario ambiental más realista.

### 7.3 Ensayos *in vivo* con el bivalvo marino *Mytilus galloprovincialis*

#### 7.3.1 Concentración de Ag en agua y tejido blando

Las nanopartículas de plata demostraron ser esféricas con un tamaño de partícula de aproximadamente 30 nm, según los resultados arrojados por TEM y SEM. Fueron altamente estables en fase acuosa, dado que sólo un 1.3% de iones  $\text{Ag}^+$  fue liberado luego de 24 h. Al igual que lo reportado respecto al otro lote de AgNP, este hecho se lo atribuye a la eficiente estabilización del PVP.

Quedan pendientes las mediciones de acumulación de Ag provenientes de las AgNP en el medio de agua de mar natural. Respecto a los resultados de acumulación en tejido blando, se pudo evidenciar un aumento de la concentración de Ag en el tejido de los bivalvos expuestos a 1 y 10  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  luego de 96 h de exposición.

Antes que las AgNP ejerzan sus efectos tóxicos, en primer lugar, la partícula debe estar biodisponible para la célula, o al menos el acceso debe ser facilitado por la forma iónica de la Ag [285]. En el presente estudio fue evidente la biodisponibilidad de la Ag por parte de las células que componen el tejido blando de *Mytilus galloprovincialis* luego de la exposición a ambas concentraciones de AgNP. Similarmente, altos niveles de Ag fueron hallados en tejido blando del molusco *Scrobicularia plana* expuestos a 10  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$  por 14 días a través del medio acuoso y por la dieta [68]. Los niveles de Ag fueron mayores en el caso de la exposición por vía acuosa respecto a la dieta. Según estos resultados, la exposición a través del medio circundante de los bivalvos sería más importante en términos de biodisponibilidad de Ag para su acumulación. Consideramos este aspecto importante dado que en los escenarios reales los organismos están siempre en contacto con el agua circundante donde están suspendidas las AgNP. Si bien sería interesante evaluar una sinergia de ambas exposiciones, creemos que la mayor urgencia y relevancia recae en la exposición a las AgNP a través del medio de solución por el constante ingreso de las nanopartículas provenientes de diversas fuentes (por producción, utilización y deshecho) a los ambientes.



También se hallaron niveles altos de Ag en tejido de ostras recolectadas de estuarios contaminados, donde la ruta principal de absorción fue atribuida a la presencia de metales disueltos [286]. Particularmente, la principal ruta de absorción para Ag fue explicada por la desorción de materia en fase particulada mediante la formación de complejos cloruros. Entonces, estos complejos favorecerían la dispersión de la Ag disuelta biodisponible para la biota [287], mientras que los bivalvos marinos son un blanco fácil para su incorporación [68]. Osterheld et al. [288] explicaron que las AgNP pueden ingresar a través de los canales iónicos o por endocitosis, y a la vez estos mecanismos pueden darse de manera simultánea y ejercer un efecto de sinergia. En cuanto a la cinética de las AgNP, Al-Sid-Cheikh et al. [289] sugieren que siguen las mismas rutas que la alimentación suspendida en el agua, la cual queda atrapada en las células de mucus y así son transportadas a través de acciones ciliares a la glándula digestiva.

En tejido blando de *M. galloprovincialis* expuestos a  $10 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  por 15 días se evidenció una alta acumulación de Ag, la cual fue explicada en términos de dilución de las AgNP, posiblemente asociada con la presencia de los complejos cloro-Ag [110]. De acuerdo a nuestros resultados, la cinética de estos complejos sería lo suficientemente rápida para permitir que las AgNP se bioacumulen en el tejido de los moluscos luego de exposiciones de corta duración. Gomes et al. [110] explican que, al igual que en el presente estudio, sólo un pequeño porcentaje de las AgNP estuvo en el agua de forma disuelta, por lo que la bioacumulación de Ag no podría explicarse sólo a partir de la formación de estos complejos, sino que también debería atribuirse a mecanismos asociados a la forma “nano”.

La internalización celular de las AgNP fue estudiada en el epitelio intestinal del poliqueto de estuario *Nereis diversicolor* y la ruta de entrada principal fue atribuida como la endocitosis [285]. Además, se encontró una alta acumulación de Ag en la fracción de metalotioneínas en estos gusanos expuestos a AgNP a través del sedimento. A pesar que la absorción de las AgNP en este poliqueto podría diferir de los moluscos, se debe destacar que la fracción enriquecida con MT confirma la importancia de estas proteínas en procesos de detoxificación de Ag. Esto resulta

consistente con los resultados hallados en este estudio en la glándula digestiva de los moluscos expuestos a  $10 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$ , donde la inducción de MT fue significativa.

### 7.3.2 Desestabilización de la membrana lisosomal

La desestabilización de las membranas lisosomales (DML) es un índice que constituye una herramienta rápida y útil para medir el daño generado por la exposición a contaminantes inorgánicos como orgánicos, dado que los lisosomas son los principales sitios donde ocurre el secuestro de tóxicos y los consecuentes mecanismos de detoxificación [147]. Los resultados del presente estudio demostraron un aumento de la desestabilización de la membrana lisosomal (DML) en la hemolinfa de los moluscos luego de la exposición a ambas concentraciones de AgNP ( $1$  y  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Las alteraciones en las membranas celulares facilitan la penetración de AgNP de pequeño tamaño y la liberación de lipopolisacáridos y otros componentes celulares al medio extracelular [288]. En este estudio, observamos un aumento de la DML luego de la exposición a ambas concentraciones de AgNP, lo que evidencia un colapso en el rol protector de los lisosomas en los hemocitos de *M. galloprovincialis*. En concordancia con este estudio, en la hemolinfa de *Crassostrea virginica* expuesta a  $0$ - $100 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  por  $140$  min se manifestó una disminución de la actividad endocítica [146]. Estos resultados son de suma importancia dado que los bivalvos son un ítem marino ecológico y económicamente importante, por lo que cualquier cambio en el funcionamiento de los hemocitos podría alterar la absorción y prevalencia de patógenos. Esto podría afectar la viabilidad de los moluscos, así como la incidencia de enfermedades gastrointestinales en humanos que los consuman. Luego de una exposición *in vitro* de hemocitos de *M. galloprovincialis*, la DML aumentó y los efectos tóxicos fueron atribuidos en parte a la disolución de los iones  $\text{Ag}^+$  provenientes de las AgNP, pero también a la absorción de las partículas, digestión a través de compartimientos endosomales o lisosomales, y a la liberación de este ion dentro de los lisosomas [125].

### 7.3.3 Test de micronúcleos

Los micronúcleos pueden manifestarse como resultado de la fragmentación del ADN o por la interacción de xenobióticos con el huso acromático en células en división. Entonces, representan una medida de daño o rotura del cromosoma y el ADN, por lo que las AgNP tendrían el potencial de no sólo causar daño, sino también de inducir un gran número de genes asociados al estrés [133]. En el presente estudio, se observó un aumento en la frecuencia de micronúcleos (MN) en los hemocitos de *M. galloprovincialis* luego de la exposición a ambas concentraciones de AgNP. Desafortunadamente, existe poca evidencia que reporte los MN como biomarcador tras la exposición de invertebrados a AgNP. Kawata et al. [133] expusieron células humanas a AgNP y evidenciaron una regulación ascendente de genes asociados con la reparación de ADN y un aumento de MN. Sus resultados no coincidirían con lo acordado por USEPA (United States Environmental Protection Agency), al no considerar a la plata como un elemento potencial cancerígeno para los humanos. A pesar que Kawata et al. [133] llevaron a cabo un estudio con concentraciones mucho mayores que las propuestas en este estudio (y las predichas ambientalmente), sugieren que las concentraciones locales de AgNP en los tejidos alcanzan niveles mucho mayores, como ocurrió en el tejido blando de los moluscos en este estudio. Por lo tanto, los efectos no deberían subestimarse cuando se trata de concentraciones que los órganos pueden bioacumular. Otras investigaciones también han reportado efectos genotóxicos causados por las AgNP. En hemocitos de *M. galloprovincialis* expuestos a 10 µg AgNP L<sup>-1</sup> *in vivo* por 15 días [109] e *in vitro* [125] se evidenció daño en el ADN mediante el ensayo cometa. Los iones Ag<sup>+</sup> se unen covalentemente con el ADN y causan diferentes tipos de daños al inhibir su síntesis y prevenir la división celular y replicación de ADN. Además, cuando las AgNP ingresan a las células dañan la cadena respiratoria de las mitocondrias, lo que permite que se produzcan ROS fácilmente y así se interrumpa la síntesis de ATP [125], [130]. También se ha reportado aumento de MN [123] y daño en el ADN [169] en eritrocitos del pez *Piaractus mesopotamicus* expuestos a 25 µg AgNP L<sup>-1</sup> por 24 h, en donde se empleó la misma marca de AgNP que en este estudio.

Hasta la fecha, la nano-genotoxicidad en las células de los bivalvos no es conocida en profundidad, particularmente respecto a la frecuencia de MN generados por la exposición a NP, como las AgNP. Sin embargo, es sabido que el pequeño tamaño de las AgNP les permite penetrar el núcleo de las células a través de los complejos de poros o proteínas nucleares por su pequeño tamaño, y allí generar daño en el ADN al interaccionar con el mismo, o con las proteínas nucleares. Sin embargo, otros factores que facilitan este ingreso al núcleo son la carga superficial de las nanopartículas, el potencial de liberación de iones metálicos y la generación de sobreproducción de ROS [109], [134], [291]. En este estudio, los efectos de las AgNP no estuvieron limitados sólo a estrés oxidativo, sino que también produjeron un aumento de LPO e indujeron las MT.

#### 7.3.4 Estrés oxidativo

En la glándula digestiva de los moluscos se hallaron alteraciones en los marcadores de estrés oxidativo y en el contenido de metalotioneínas (MT). Este órgano resultó ser particularmente sensible a los efectos tóxicos de las AgNP, aun cuando se incluyen tiempos cortos de exposición y concentraciones bajas, como en el presente estudio. Cuando los bivalvos se alimentan las NP ingresan al organismo a través de la filtración, y una vez que superan esta primera barrera, los agregados depositados en las branquias y los de mayor tamaño se acumulan en la glándula digestiva y parcialmente se transfieren a la hemolinfa [292].

La actividad antioxidante de la enzima GST aumentó luego de la exposición a 10  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$ . Sin embargo, la enzima CAT mantuvo niveles de actividad similares a los del grupo control, por lo que el sistema de defensa antioxidante no fue lo suficientemente eficaz para prevenir el daño oxidativo en el tejido cuando los moluscos fueron expuestos a la mayor concentración (10  $\mu\text{g AgNP L}^{-1}$ ). Como se mencionó antes, está ampliamente reportado que la generación de ROS a partir de exposiciones de AgNP es uno de los principales mecanismos de toxicidad por parte de las partículas metálicas [80]. La activación de la enzima CAT (no observada en este estudio) podría haber sido clave para evitar el daño oxidativo en los lípidos, dado que es considerada una de las

primeras defensas ante la toxicidad del oxígeno [119]. En el hepatopáncreas del molusco *Crassostrea virginica* expuestos a bajas concentraciones de AgNP ( $0.2\text{--}20\ \mu\text{g L}^{-1}$ ) por 48 h, se hallaron inducciones de las enzimas CAT y SOD, además de un aumento en los niveles de LPO [124]. En la glándula digestiva de *M. galloprovincialis* expuestos a  $10\ \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  por 15 días se evidenciaron respuestas de estrés oxidativo más graves que en otros órganos, lo que sugiere que los efectos de las ROS son más severos en la glándula digestiva. Cuando la exposición a AgNP fue comparada con la de  $\text{Ag}^+$ , fue evidente una mayor capacidad oxidativa por parte de las nanopartículas, probablemente debido a la gran disponibilidad de iones liberados por parte de ellas en combinación con efectos ejercidos por sus propiedades intrínsecas [110].

### 7.3.5 Metalotioneínas

El elemento Ag presenta una alta afinidad a los grupos -SH, los cuales son abundantes en los residuos de cisteína de las metalotioneínas (MT). Las MT tienen un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y en procesos de detoxificación de los organismos bivalvos [293]. En el presente estudio, se observó una inducción de las MT en la glándula digestiva de los moluscos expuestos a la mayor concentración de AgNP ( $10\ \mu\text{g L}^{-1}$ ). Este resultado es consistente con lo hallado por Gomes et al. [110], quienes expusieron a *M. galloprovincialis* a bajas concentraciones de AgNP por 15 días. Los autores explicaron que las AgNP son capaces de unirse a las MT para que ellas regulen el metabolismo de Ag, detoxifiquen los iones  $\text{Ag}^+$  y/o eliminen las ROS. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio evidencian que la acción por parte de las MT no fue suficiente para evitar el daño oxidativo en el tejido. En el hepatopáncreas de *C. virginica* expuestos a  $0.16\text{--}15\ \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  por 48 h se evidenció un aumento de MT que fue asociado con la vía de respuestas sensibles a metales (“metal-responsive pathways”), o también al hecho que las AgNP aumentan los oxiradicales, entonces las MT cumplen con su rol antioxidante [111].

En general, los efectos tóxicos observados en este estudio pueden relacionarse con el efecto “caballo de Troya” ejercido por las AgNP cuando se internalizan dentro de las células [18]: sobreproducción de ROS y consecuente daño oxidativo en la glándula

digestiva, activación de la enzima antioxidante GST y daño en el ADN en el caso de los hemocitos de *M. galloprovincialis*. Las exposiciones cortas revelan información relevante para comprender los efectos tóxicos provocados por las nanopartículas metálicas, y a la vez ahorran tiempo y permiten obtener un análisis más rápido de este contaminante emergente que aumenta exponencialmente en los ambientes acuáticos.

### 7.3.6 Actividad de transportadores de membrana

El mecanismo exacto de los transportadores de membrana que componen la resistencia múltiple a xenobióticos (MXR, *multi xenobiotic resistance*, compuesto por los transportadores ABC) aún no está completamente elucidado. Representan una primera línea de defensa en la protección de las células y organismos ante los compuestos tóxicos, dado que cumplen la función de transferir compuestos dañinos afuera de la célula [294]. Su rol es central en la resistencia a antibióticos y antifúngicas en microorganismos, y en humanos en la resistencia de drogas para tratamientos contra el cáncer, fibrosis quística y otras enfermedades genéticas. A pesar que la mayoría de ellos son componentes de un sistema de transporte activo, algunos se acoplan con la actividad de ATPasas y participan en procesos biológicos como la reparación del ADN [295].

En las branquias de *M. galloprovincialis* expuestos a  $1 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$  se evidenció una disminución de la actividad de los transportadores de membrana. Sin embargo, en el caso de la mayor concentración a AgNP ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) los niveles fueron similares a los del grupo control. Controversialmente, Katsumiti et al. [125] evidenciaron un aumento de la actividad de MXR en células branquiales del molusco expuestas *in vitro* a varias concentraciones de AgNP. Los autores explicaron que la actividad del MXR es clave para la detoxificación de Ag ya que reduce su acumulación, y consecuentemente, los potenciales daños en las células. Por otro lado, las AgNP podrían alterar las funciones normales fisiológicas de las proteínas transmembrana en la superficie celular, como los canales iónicos. Esta conclusión podría explicar la inhibición de MXR observada en el presente estudio ante la concentración de  $1 \mu\text{g AgNP L}^{-1}$ . Este resultado es de suma importancia dado que la concentración intracelular de un xenobiótico puede aumentar

y llegar a niveles mayores que generen efectos tóxicos más graves en los organismos [296].

La inhibición de MXR observada en este estudio coincide con los resultados en *Daphnia magna* luego de una exposición *in vivo* a 0.6-5 mg AgNP L<sup>-1</sup>. Esto ocurrió debido a que las nanopartículas reaccionarían con los grupos sulfhidrilos y aminos de los transportadores, y por lo tanto alterarían su correcta funcionalidad [294]. Los autores resaltaron que es necesario un mejor entendimiento de este tema, dada la importancia del sistema MXR como mecanismo de defensa en conjunto con las glicoproteínas-P. Sus resultados concluyen que las AgNP con tamaño de partícula de 23 nm fueron mayormente absorbidas por las células que las de tamaño mayor (por ejemplo, de 200 nm). Entonces, las partículas pequeñas son más velozmente absorbidas y por lo tanto liberan iones intracelulares más fácilmente. Consideramos esta última conclusión relevante dado que en el stock de AgNP utilizado en este estudio se hallaban en suspensión partículas pequeñas de tamaño promedio ~30 nm (según los análisis TEM y SEM). Efectivamente, este tipo de AgNP es liberado de productos comerciales de venta libre. La producción, uso y liberación de estas sustancias basadas en AgNP están en aumento y esto no puede ser descartado con una seria amenaza a la biota acuática, así como también a la salud humana.

## 8. CONCLUSIONES

El gran espectro de aplicaciones y beneficios de las AgNP, principalmente debido a sus propiedades biocidas, y su consecuente liberación a los ambientes acuáticos es una problemática y preocupación de alcance mundial. A fin de legislar y regular su producción, utilización y liberación, es prioritario contar con investigaciones científicas que estudien concentraciones ambientalmente relevantes y la exposición de organismos no blanco, como los acuáticos. Esto es fundamental, dado que estos ambientes siempre constituyen los sumideros finales.

En este trabajo de tesis se obtuvo información valiosa a partir de diferentes tipos de ensayos (*in vivo*, *ex vivo*), organismos test (peces, moluscos), y medios de exposición (agua dulce y de mar, solución salina). La aplicación de una batería de biomarcadores permitió demostrar la toxicidad de bajas concentraciones de AgNP de uso comercial.

La exposición a AgNP ejerció un claro efecto biocida sobre las comunidades bacterianas que viven en el mucus epidérmico de los peces, lo cual evidencia la vulnerabilidad de su primera línea de defensa. Las AgNP fueron absorbidas y acumuladas en diferentes tejidos luego de ambas concentraciones y tiempos de exposición. Allí, en los peces ejercieron efectos tóxicos tales como estrés oxidativo, cambios en parámetros hematológicos e histológicos y alteraciones de reservas energéticas. En moluscos, además de estrés oxidativo, se produjo desestabilización de la membrana de los hemocitos, inducción de metalotioneínas, genotoxicidad y daño en los transportadores de membrana. Por otra parte, se demostró que el estrés oxidativo producido por AgNP y AgNO<sub>3</sub> puede ser atenuado cuando las sustancias húmicas están presentes en el medio. De aquí se desprende la necesidad de continuar con estudios que expliquen el destino e interacciones de las AgNP con diferentes componentes del medio acuático.

Los resultados obtenidos contribuyen a comprender los principales mecanismos de toxicidad de las AgNP en organismos acuáticos, y a su vez son relevantes a la hora de pensar escenarios reales de exposición. La información generada podrá ser de utilidad



por parte de las autoridades competentes para asegurar la protección del medio ambiente, el establecimiento de valores guía para la protección de la biota acuática autóctona y la sustentabilidad de la industria nanotecnológica.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Bystrzejewska-Piotrowska G, Golimowski J, Urban PL (2009). Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Manage* 29(9):2587-95. DOI: 10.1016/j.wasman.2009.04.001.
- [2] Mansoori GA, Rohani Bastami T, Ahmadpour A, Eshaghi Z (2008). Chapter 2: Environmental application of nanotechnology. *Nano Res* 2(2).
- [3] Mansoori GA, Soelaiman T (2005). Nanotechnology - An Introduction for the standards community. *Journal of ASTM International* 2(6): 1-22. DOI: 10.1520/JAI13110. ISSN 1546-962X
- [4] Mahaye N, Thwala M, Cowan DA, Musee N (2017). Genotoxicity of metal based engineered nanoparticles in aquatic organisms: a review. *Mutat Res* 773: 134-160. DOI: 10.1016/j.mrrev.2017.05.004
- [5] Roco MC (2003). Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Curr Opin Biotechnol* 14: 337-346. DOI: 10.1016/S0958-1669(03)00068-5
- [6] SCENIHR (2005). Opinion on the appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, European Commission SCENIHR/002/05.
- [7] Moore MN, Allen JI, McVeigh A (2006). Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Mar Environ Res* 61: 278-304. DOI: 10.1016/j.marenvres.2005.10.005
- [8] Pulit-Prociak J, Banach M (2016). Silver nanoparticles - a material of the future...? *Open Chem* 14: 76-91. DOI: 10.1515/chem-2016-0005
- [9] Khatoon S, Ahmad T (2012). Synthesis, optical and magnetic properties of Ni-doped ZnO nanoparticles. *J Mater Sci Eng* 6(B): 325-333.
- [10] Jayalakshmi M, Mohan Rao M, Bum Kim K (2006). Effect of particle size on the electrochemical capacitance of a-Ni(OH)<sub>2</sub> in alkali solutions. *Int J Electrochem Sci* 1: 324-333.
- [11] Jie J, Zhang W, Bello I, Lee C, Lee S (2010). One-dimensional II–VI nanostructures: Synthesis, properties and optoelectronic applications. *Nano Today* 5: 313-336. DOI: 10.1016/j.nantod.2010.06.009
- [12] Cheng MM, Cuda G, Bunimovich YL, Gaspari M, Heath JR, Hill HD, Mirkin CA, Nijdam J, Terracciano R, Thundat T, Ferrari M (2006). Nanotechnologies for biomolecular detection and medical diagnostics. *Curr Opin Chem Biol* 10: 11-19. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.01.006
- [13] Kikuchi M (2007). Nanotechnology impact towards biomedical engineering. *Biocybern Biomed Eng* 27: 27-32.
- [14] Davies JC (2009). Oversight of next generation nanotechnology, Woodrow Wilson International Center for Scholars, Project on Emerging Nanotechnologies.
- [15] European Commission (2015). Nanomaterials, The global market, Forecast from 2010 to 2025, Future markets, Ed. 2.

- 
- [16] Shaw BJ, Handy RD (2011). Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions. *Environ Int* 37: 1083-1097. DOI: 10.1016/j.envint.2011.03.009
- [17] Handy RD, von der Kammer F, Lead JR, Hassellöv M, Owen R, Crane M (2008a). The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology* 17: 287-314. DOI: 10.1007/s10646-008-0199-8
- [18] Magesky A, Pelletier E (2018). Cytotoxicity and physiological effects of silver nanoparticles on marine invertebrates. Q. Saquib et al. (eds.), *Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles, Advances in Experimental Medicine and Biology*. DOI: 10.1007/978-3-319-72041-8\_17
- [19] Boxall ABA, Chaudhry Q, Sinclair C, Jones A, Aitken R, Jefferson B, Watts C (2007). Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles. Central Science Laboratory, Department of the Environment and Rural Affairs, London, UK.
- [20] Hoet PH, Nemmar A, Nemery B (2004). Health impact of nanomaterials? *Nat Biotechnol* 22:19.
- [21] Di Toro DM, Zarba CS, Hansen DJ, Berry WJ, Swartz RC (1991). Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environ Toxicol Chem* 10:1541-1583. DOI: 10.1002/etc.5620101203
- [22] Klaine S, Alvarez P, Batley G, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, Mahendra S, McLaughlin MJ, Lead JR (2008). Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem* 27(9): 1825-1851. DOI: 10.1897/08-090.1
- [23] Baker TJ, Tyler CR, Galloway TS (2014). Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environ Pollut* 186: 257-271. DOI: 10.1016/j.envpol.2013.11.014
- [24] Zhang Y, Chen Y, Westerhoff P, Crittenden J (2009). Impact of natural organic matter and divalent cations on the stability of aqueous nanoparticles. *Water Res* 43: 4249-4257. DOI: 10.1016/j.watres.2009.06.005
- [25] Bielmyer GK, Grosell M, Brix KV (2006). Toxicity of silver, zinc, copper, and nickel to the copepod *Acartia tonsa* exposed via a phytoplankton diet. *Environ Sci Technol* 40: 2063-2068. DOI: 10.1021/es051589a
- [26] Batley GE, Kirby JK, McLaughlin MJ (2013). Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments. *Acc Chem Res* 46(3): 854-862. DOI: 10.1021/ar2003368
- [27] Wong SW, Leung PT, Djuricic AB, Leung KM (2010). Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: Influences of aggregate size and ion solubility. *Anal Bioanal Chem* 396: 609-618. DOI: 10.1007/s00216-009-3249-z
- [28] Middelburg JJ, Hennan PMJ. 2007. Organic matter processing in tidal estuaries. *Mar Chem* 106: 127-147. DOI: 10.1016/j.marchem.2006.02.007
- [29] Yamashita Y, Tsukasaki A, Nishida T, Tanoue E (2007). Vertical and horizontal distribution of fluorescent dissolved organic matter in the Southern Ocean. *Mar Chem* 106:498-509. DOI: 10.1016/j.marchem.2007.05.004
- [30] Simpkins K (1990). Surface effects in ecotoxicology. *Funct Ecol* 4:303-308.

- 
- [31] Wurl O, Obbard JP (2004). A review of pollutants in the sea surface microlayer (SML): A unique habitat for marine organisms. *Mar Pollut Bull* 48: 1016-1030. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2004.03.016
  - [32] Miller RJ, Lenihan HS, Muller EB, Tseng N, Hanna, SK, Keller AA (2010). Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton. *Environ Sci Technol* 44: 7329-7334. DOI: 10.1021/es100247x
  - [33] Fairbairn EA, Keller AA, Madler L, Zhou D, Pokhrel S, Cherr GN (2011). Metal oxide nanomaterials in seawater: Linking physicochemical characteristics with biological response in sea urchin development. *J Hazard Mater* 192: 1565-1571. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.06.080
  - [34] Yang X, Gondikas AP, Marinakos SM, Auffan M, Liu J, Hsu-Kim H, Meyer JN (2012). Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. *Environ Sci Technol* 46: 1119-1127. DOI: 10.1021/es202417t
  - [35] Bhatt I, Tripathi BN (2011). Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. *Chemosphere* 82(3): 308-317. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.10.011
  - [36] Studart AR, Amstad E, Gauckler LJ (2007). Colloidal stabilization of nanoparticles in concentrated suspensions. *Langmuir* 23: 1081-1090. DOI: 10.1021/la062042s
  - [37] Liu W, Wu Y, Wang C, Li HC, Wang T, Liao CY, Cui L, Zhoy QF, Yan B, Jiang GB (2010). Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. *Nanotoxicology* 4(3): 319-330. DOI: 10.3109/17435390.2010.483745
  - [38] Lu X, Tian Y, Zhao Q, Jin T, Xiao S, Fan X (2011). Integrated metabonomics analysis of the size-response relationship of silica nanoparticles-induced toxicity in mice. *Nanotechnology* 22(5): 055101. DOI: 10.1088/0957-4484/22/5/055101
  - [39] Wang Z, Chen J, Li X, Shao J, Willie WJGM (2013). Aquatic toxicity of nanosilver colloids to different trophic organisms: Contributions of particles and free silver ion. *Environ Toxicol Chem* 31(10): 2408-2413. DOI: 10.1002/etc.1964
  - [40] Gliga AR, Skoglund S, Odnevall Wallinder I, Fadeel B, Karlsson HL (2014). Size-dependent cytotoxicity of silvernanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol* 11:11.
  - [41] Park MVDZ, Neigh AM, Vermeulen JP, de la Fonteyne LJJ, Verharen HW, Briedé JJ, Van Loveren H, de Jong WH (2011). The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* 32: 9810-9817. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.085
  - [42] De Marzi MC, Saraceno M, Mitarotonda R, Todone M, Fernandez M, Malchiodi EL, Desimone MF (2017). Evidence of size-dependent effect of silica micro- and nano-particles on basal and specialized monocyte functions. *Ther Deliv* 8(12): 1035-1049. DOI: 10.4155/tde-2017-0053
  - [43] Wang T, Bai J, Jiang X, Nienhaus GU (2012). Cellular uptake of nanoparticles by membrane penetration: a study combining confocal microscopy with FTIR spectroelectrochemistry. *ACS Nano* 6: 1251-1259. DOI: 10.1021/nn203892h
  - [44] Luoma SN (2008). Silver nanotechnologies and the environment: old problems or new challenges? Woodrow Wilson International center for scholar, Project on Emerging Nanotechnologies. The PEW Charitable Trusts.

- 
- [45] Nelson SM, Mahmoud T, Beaux M, Shapiro P, McIlroy DN, Stenkamp DL (2010). Toxic and teratogenic silica nanowires in developing vertebrate embryos. *Nanomedicine* 6: 93-102. DOI: 10.1016/j.nano.2009.05.003.
- [46] Stoehr LC, Gonzalez E, Stampfl A, Casals E, Duschl A, Puentes V, Oostingh GJ (2011). Shape matters: effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells. *Part Fibre Toxicol* 8:36.
- [47] George S, Lin S, Ji Z, Thomas CR, Li LJ, Mecklenburg M, Meng H, Wang X, Zhang H, Xia T, Hohman JN, Lin S, Zink JI, Weiss PS, Nel AE (2012). Surface defects on plate-shaped silver nanoparticles contribute to its hazard potential in a fish gill cell line and zebrafish embryos. *ACS Nano* 6(5): 3745-3759. DOI: 10.1021/nn204671v
- [48] Mehennaoui K, Cambier S, Serchi T, Ziebel J, Lentzen E, Valle N, Guérol F, Thomann J-S, Giamberini L, Gutleb AC (2018). Do the pristine physico-chemical properties of silver and gold nanoparticles influence uptake and molecular effects on *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda)? *Sci Tot Environ* 643: 1200-1215. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.208
- [49] Pinto VV, Ferreira MJ, Silva R, Santos HA, Silva F, Pereira CM (2010). Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: Effect of the synthesis and storage conditions. *Colloid Surface A* 364: 19-25. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2010.04.015
- [50] Wijnhoven SWP, Peijnenburg WJGM, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EHW, Roszek B, Bisschops J, Gosens I, Van De Meent D, Dekkers S, De Jong WH, van Zijverden M, Sip AAM, Geertsma RE (2009). Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* 3: 109-138. DOI: 10.1080/17435390902725914
- [51] McGillicuddy E, Murray I, Kavanagh S, Morrisond L, Fogarty A, Cormican M, Dockery P, Prendergast M, Rowan N, Morris D (2017). Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Sci Tot Environ* 575: 231-246. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.041
- [52] Massarsky A, Trudeau VL, Moon TW (2014a). Predicting the environmental impact of nanosilver. *Environ Toxicol Phar* 38: 861-873. DOI: 10.1016/j.etap.2014.10.006
- [53] Preet Singh R, Ramarao P (2012). Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Let* 213: 249-259. DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.07.009
- [54] Sharma VK, Siskova KM, Zboril R, Gardea-Torresdey JL (2014). Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity. *Adv Colloid Interfac* 204: 15-34. DOI: 10.1016/j.cis.2013.12.002
- [55] Ki HY, Kim JH, Kwon SC, Jeong SH (2007). A study on multifunctional wool textiles treated with nano-sized silver. *J Mater Sci* 42: 8020-8024. DOI: 10.1007/s10853-007-1572-3
- [56] Ratyakshi N, Chauhan RP (2009). Colloidal synthesis of silver nano particles. *Asian J Chem* 21: S113-116.
- [57] Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH (2008). Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microb* 74: 2171-2178.
- [58] Wright JB, Lam K, Hansen D, Burrell RE (1999). Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens. *Am J Infect Control* 27: 344-350. DOI: 10.1016/S0196-6553(99)70055-6

- [59] Shahverdi AR, Fakhimi A, Shahverdi HR, Minaian S (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomed-Nanotechnol* 3: 168-171. DOI: 10.1016/j.nano.2007.02.001
- [60] Elechiguerra JL, Burt JL, Morones-Ramirez JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, Yacaman MJ (2005). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnology* 3(6): 6. DOI: 10.1186/1477-3155-3-6.
- [61] Mehrbod P, Motamed N, Tabatabaian M, Soleimani Estyar R, Amini E, Shahidi M, Kheiri MT (2009). In vitro antiviral effect of nanosilver on influenza virus. *Daru* 17: 88-93.
- [62] Keuk-Jun K, Sung WS, Moon SK, Choi JS, Kim JG, Lee DG (2008). Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J Microbiol Biotechnol* 18: 1482-1484.
- [63] Naghsh N, Safari M, Hajmehrabi P (2012). Comparison of nanosilver inhibitory effects growth between *Aspergillus niger* and *E. coli*. *Indian J Sci Technol* 5: 2448-2450.
- [64] McGillicuddy E, Murray I, Kavanagh S, Morrisond L, Fogarty A, Cormican M, Dockery P, Prendergast M, Rowan N, Morris D (2017). Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Sci Tot Environ* 575: 231-246. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.041
- [65] Tulve NS, Stefaniak AB, Vance ME, Rogers K, Mwilu S, LeBouf RF, Schwegler-Berry D, Willis R, Thomas TA, Marr LC (2015). Characterization of silver nanoparticles in selected consumer products and its relevance for predicting children's potential exposures. *Int J Hyg Environ Health* 218: 345-357. DOI: 10.1016/j.ijheh.2015.02.002
- [66] Ribeiro F, Gallego-Urrea JA, Jurkschat K, Crossley A, Hassellöv M, Taylor C, Soares AMVM, Loureiro S (2014). Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Sci Total Environ* 466-467: 232-241. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.06.101
- [67] Gottschalk F, Sun TY, Nowack B (2013). Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. *Environ Poll* 181: 287-300. DOI: 10.1016/j.envpol.2013.06.003
- [68] Buffet P-E, Pan J-F, Poirier L, Amiard-Triquet C, Amiard J-C, Gaudin P, Risso-deFaverney C, Guibbolini M, Gilliland D, Valsami-Jones E, Mouneyrac C (2013). Biochemical and behavioural responses of the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* to silver nanoparticles in seawater and microalgal food. *Ecotox Environ Safe* 89: 117-124. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.11.019
- [69] USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1980. Ambient water quality criteria for silver. Washington DC US Environmental Protection Agency (44/5-80-071).
- [70] Ranville MA, Flegal AR (2005). Silver in the North Pacific Ocean. *Geochem Geophys* 6(3) 1-13. DOI: 10.1029/2004GC000770
- [71] Gallon C, Flegal AR (2015). Sources, fluxes and biogeochemical cycling of silver in the oceans. In: Whitacre DM (ed) Reviews of environmental contamination and toxicology, v. 235. Springer, Cham.
- [72] Kaegi R, Voegelin A, Sinnet B, Zuleeg S, Hagendorfer H, Burkhardt M, Siegrist H (2010). Behavior of metallic silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant. *Environ Sci Technol* 45: 3902-3908. DOI: 10.1021/es1041892

- [73] Farkas J, Peter H, Christian P, Gallego Urrea JA, Hassellöv M, Tuoriniemi J, Gustafsson S, Olsson E, Hylland K, Thomas KV (2011a). Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine. *Environ Int* 37: 1057-1062. DOI: 10.1016/j.envint.2011.03.006
- [74] Benn TM, Westerhoff P (2008). Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environ Sci Technol* 42(11):4133-4139. DOI: 10.1021/es7032718
- [75] Geranio L, Heuberger M, Nowack B (2009). The behavior of silver nanotextiles during washing. *Environ Sci Technol* 43: 8113-8118. DOI: 10.1021/es9018332
- [76] Benn TM, Cavanagh B, Hristovski K, Posner JD, Westerhoff P (2010). The release of nanosilver from consumer products used in the home. *J Environ Qual* 39(6): 1875-1882.
- [77] Mackevica A, Olsson ME, Foss Hansen S (2016). Silver nanoparticle release from commercially available plastic food containers into food simulants. *J Nanopart Res* 18: 5. DOI: 10.1007/s11051-015-3313-x
- [78] Ratte HT (1999). Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environ Toxicol Chem* 18: 89-108. DOI: 10.1002/etc.5620180112
- [79] Park E-J, Yi J, Kim Y, Choi K, Park K (2010). Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicol In Vitro* 24: 872-878. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.12.001
- [80] McShan D, Ray PC, Yu H (2014). Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J Food Drug Anal* 22(1): 116-127. DOI: 10.1016/j.jfda.2014.01.010
- [81] Levard C, Hotze EM, Lowry GV, Brown GE J (2012). Environmental transformations of silver nanoparticles: Impact on stability and toxicity. *Environ Sci Technol* 46: 6900-6914. DOI: 10.1021/es2037405
- [82] Choi O, Clevenger TE, Deng B, Surampalli RI, Ross L Jr, Hu Z (2009). Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water Res* 43: 1879-1886. DOI: 10.1016/j.watres.2009.01.029
- [83] Ma R, Levard C, Marinakos SM, Cheng Y, Liu J, Michel FM, Brown GE, Lowry GV (2012). Size-controlled dissolution of organic-coated silver nanoparticles. *Environ Sci Technol* 46(2): 752-759. DOI: 10.1021/es201686j
- [84] Yin Y, Yang X, Zhou X, Wang W, Yu S, Liu J, Jiang G (2015). Water chemistry controlled aggregation and photo-transformation of silver nanoparticles. *J Environ Sci* 116-125. DOI: 10.1016/j.jes.2015.04.005
- [85] Zheng Q, Zhou M, Deng W, Le CX (2015). Is there a silver lining? Aggregation and photo-transformation of silver nanoparticles in environmental waters. *J Environ Sci* 34: 259-262. DOI: 10.1016/j.jes.2015.07.002
- [86] Balarezo AL, Jones VN, Yu H, Hwang H-M (2002). Influence of humic acid on 1-aminopyrene ecotoxicity during solar photolysis process. *Int J Mol Sci* 3: 1133-44. DOI: 10.3390/i3111133.
- [87] Navarro E, Piccapetra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Sigg L, Behra R (2008). Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Sci Technol* 42(23): 8959-8964. DOI: 10.1021/es801785m
- [88] Kvitek L, Panacek A, Soukupova J, Kolar M, Vecerova R, Pucek R, Holecová M, Zboril R (2008). Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles. *J Phys Chem C* 112(5): 5825-5834. DOI: 10.1021/jp711616v

- 
- [89] Gao J, Powers K, Wang Y, Zhou H, Roberts SM, Moudgil BM, Koopman B, Barber DS (2012). Influence of Suwannee River humic acid on particle properties and toxicity of silver nanoparticles. *Chemosphere* 89: 96-101.
  - [90] Gao J, Youn S, Hovsepyan A, Llana VL, Wang Y, Bitton G, Jean-Claude JB (2009). Dispersion and toxicity of selected manufactured nanomaterials in natural river water samples: effects of water chemical composition. *Environ Sci Technol* 43(9): 3322-3328. DOI: 10.1021/es803315v
  - [91] Kalbassi MR, Johari SA, Soltani M, Yu J (2013). Particle size and agglomeration affect the toxicity levels of silver nanoparticle types in aquatic environment. *Ecopersia* 1(3): 273-290.
  - [92] Lapresta-Fernández A, Fernández A, Blasco J (2012). Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *Trac-Trend Anal Chem* 32. DOI: 10.1016/j.trac.2011.09.007
  - [93] Choi JE, Kim S, Ahn JH, Youn P, Kang JS, Park K, Yi J, Ryu D-Y (2010). Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquat Toxicol* 100: 151-159. DOI: 10.1016/j.aquatox.2009.12.012
  - [94] Panyala NR, Peña-Méndez EM, Havel J (2008). Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health. *J Appl Biomed* 6: 117-129. ISSN 1214-0287
  - [95] Jovanovic B, Pacic D (2012). Immunotoxicology of non-functionalized engineered nanoparticles in aquatic organisms with special emphasis on fish: Review of current knowledge, gap identification, and call for further research. *Aquat Toxicol* 118-119: 141-151. DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.04.005
  - [96] Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LEJ (2001). Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev Comp Immunol* 25(8): 853-873. DOI: 10.1016/S0145-305X(01)00040-4
  - [97] McDonald DG, Wood CM (1992). Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: Rankin J.C., Jensen F.B. (eds) *Fish Ecophysiology*. Chapman & Hall Fish and Fisheries Series, vol 9. Springer, Dordrecht.
  - [98] Soltani M, Ghodrathnema M, Ahari H, Ebrahimzadeh Mousavi HA, Atee M, Dastmalchi F, Rahmánya J (2009). The inhibitory effect of silver nanoparticles on the bacterial fish pathogens, *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas hydrophila*. *Int J Vet Res* (3,2): 137-142.
  - [99] Bilberg BK, Hovgaard MB, Besenbacher F, Baatrup E (2012). In vivo toxicity of silver nanoparticles and silver ions in zebrafish (*Danio rerio*). *J Toxicol* ID 293784, 9 pp. DOI: 10.1155/2012/293784.
  - [100] Hawkins AD, Thornton C, Steevens JA, Willet KI (2014). Alteration in pimephales promelas mucus production after exposure to nanosilver or silver nitrate. *Environ Tox Chem* 33(12): 2869-2872. DOI: 10.1002/etc.2759
  - [101] Bacchetta C, López G, Pagano G, Muratt DT, de Carvalho LM, Monserrat JM (2016). Toxicological effects induced by silver nanoparticles in zebra fish (*Danio rerio*) and in the bacteria communities living at their surface. *Bull Environ Contam Toxicol* 97: 456-462. DOI: 10.1007/s00128-016-1883-7
  - [102] Fell Marques B, Cordeiro FL, Wilges Kist L, Reis Bogo M, López G, Pagano G, Tomazi Muratt D, Machado de Carvalho L, Clemes Kulkamp-Guerreiro I, Monserrat JM (2013). Toxicological effects induced by the nanomaterials fullerene and nanosilver in the polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae) and in the bacteria



- communities living at their surface. *Mar Environ Res* 99: 52-59. DOI: 10.1016/j.marenvres.2013.05.002
- [103] AshaRani P, Hande MP, Valiyaveetil S (2009). Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol* 17(10) 65. DOI: 10.1186/1471-2121-10-65
- [104] Scown TM, Santos EM, Johnston BD, Gaiser B, Baalousha M, Mitov S, Lead JR, Stone V, Fernandes TF, Jepson M, van Aerle R, Tyler CR (2010). Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicol Sci* 115(2): 521-534. DOI: 10.1093/toxsci/kfq076
- [105] Wu Y, Zhou Q (2012). Dose- and time-related changes in aerobic metabolism, chorionic disruption, and oxidative stress in embryonic medaka (*Orizyas latipes*): Underlying mechanisms for silver nanoparticles developmental toxicity. *Aquat Toxicol* 124-125: 238-246. DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.08.009
- [106] Martin JD, Colson T-LL, Langlois VS, Metcalfe CD (2016). Biomarkers of exposure to nanosilver and silver accumulation in yellow perch (*Perca flavescens*). *Environ Toxicol Chem* 9999: 1-10. DOI: 10.1002/etc.3644
- [107] Fabrega J, Luoma SN, Tyler CR, Galloway TS, Lead JR (2011). Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ Int* 37: 517-531. DOI: 10.1016/j.envint.2010.10.012
- [108] Griffitt RJ, Luo J, Gao J, Bonzongo J-C, Barber DS (2008). Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environ Toxicol Chem* 27: 1972-1978. DOI: 10.1897/08-002.1
- [109] Gomes T, Araújo O, Pereira R, Almeida AC, Cravo A, João Bebianno M (2013a). Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Environ Res* 84: 51-59. DOI: 10.1016/j.marenvres.2012.11.009
- [110] Gomes T, Pereira CG, Cardoso C, Serrao Sousa V, Ribau Teixeira M, Pinheiro JP, Joao Bebianno M (2014). Effects of silver nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Environ Res* 101: 208-214. DOI: 10.1016/j.marenvres.2014.07.004
- [111] Ringwood AH, McCarthy M, Bates TC, Carroll DL (2010). The effects of silver nanoparticles on oyster embryos. *Mar Environ Res* 69: S49-S51. DOI: 10.1016/j.marenvres.2009.10.011
- [112] Di Giulio RT, Meyer JN (2008). Reactive oxygen species and oxidative stress. En: *The Toxicology of Fishes* (Ed. Di Giulio RT, Hinton DE). CRC Press, Boca Raton, 273-326 pp.
- [113] Halliwell B, Gutteridge JMC (2007). Free Radicals in Biology and Medicine Fourth Ed. In: *The Toxicology of Fishes* (Eds. Di Giulio RT y Hinton DE). Oxford University, Press New York.
- [114] Davies KJ (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50: 279-289.
- [115] van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57-149.
- [116] Schlenk D, Handy R, Steinert S, Depledge MH, Benson W (2008). Biomarkers. En: *The Toxicology of Fishes* (Ed. Di Giulio RT, Hinton DE). CRC Press, Boca, 683-731 pp.

- 
- [117] Auffan M, Rose J, Bottero JY, Lowry GV, Jolivet JP, Wiesner MR (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol* 4: 634-641.
  - [118] He W, Liu Y, Wamer WG, Yin JJ (2014). Electron spin resonance spectroscopy for the study of nanomaterial-mediated generation of reactive oxygen species. *J Food Drug Anal* 22: 49-63. DOI: 10.1016/j.jfda.2014.01.004
  - [119] Govindasamy R, Rahuman AA (2012). Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *J Environ Sci* 24(6): 1091-1098. DOI: 10.1016/S1001-0742(11)60845-0
  - [120] Lee B, Duong CN, Cho J, Lee J, Kim K, Seo Y, Kim P, Choi K, Yoon J (2012). Toxicity of citrate-capped silver nanoparticles in Common carp (*Cyprinus carpio*). *J Biomed Biotechnol* 262670: 1-14. DOI: 10.1155/2012/262670
  - [121] Wu Y, Zhou Q, Li H, Liu W, Wang T, Jiang G (2010). Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test. *Aquat Toxicol* 100: 160-167. DOI: 10.1016/j.aquatox.2009.11.014
  - [122] Massarsky A, Abrahama R, Nguyen KC, Rippstein P, Tayabali AF, Trudeau VL, Moon TW (2014b) Nanosilver cytotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes and hepatocytes. *Comp Biochem Phys C* 159: 10-21. DOI: 10.1016/j.cbpc.2013.09.008
  - [123] Davico C, Bacchetta C, López G, Cazenave J, Poletta GL, Simoniello MF (2015). Evaluación de genotoxicidad a través de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de *Piaractus mesopotamicus* (pacúes) expuestos *in vivo* a nanopartículas de plata. *Acta Toxicológica Argentina* 23(2): 73-78.
  - [124] McCarthy MP, Carroll DL, Ringwood AH (2013). Tissue specific responses of oysters, *Crassostrea virginica*, to silver nanoparticles. *Aquat Toxicol* 138-139: 123-128. DOI: /10.1016/j.aquatox.2013.04.015
  - [125] Katsumiti A, Gilliland D, Arostegui I, Cajaraville MP (2015). Mechanisms of toxicity of Ag nanoparticles in comparison to bulk and ionic Ag on mussel hemocytes and gill cells. *Plos One* 1-30. DOI: 10.1371/journal.pone.0129039
  - [126] Bressan E, Vindigni V, Ferroni L, Cairns W, Gardin C, Rigo C, Zavan B, Stocchero M (2013). Silver nanoparticles and mitochondrial interaction. *Int J Dentistry* 1-8. DOI: 10.1155/2013/312747
  - [127] Gonzalez L, Lison D, Kirsch-Volders M (2008). Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review. *Nanotoxicology* 2(4): 252-273. DOI: 10.1080/17435390802464986
  - [128] Donaldson K, Poland CA, Schins RPF (2010). Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: Criteria for improved test strategies. *Nanotoxicology* 4(4): 414-420. DOI: 10.3109/17435390.2010.482751
  - [129] Singh N, Manshian B, Jenkins GJS, Griffiths SM, Williams PM, Maffei TGG, Wright CJ, Doak SH (2009). NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* 30: 3891-3914. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.009.
  - [130] Cong Y, Banta GT, Selcka H, Berhanu D, Valsami-Jones E, Forbes VE (2011). Toxic effects and bioaccumulation of nano-, micron- and ionic-Ag in the polychaete,

- Nereis diversicolor*. *Aquat Toxicol* 105: 403-411. DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.07.014
- [131] Karlsson HL (2010). The comet assay in nanotoxicology research. *Anal Bioanal Chem* 398: 651-666. DOI: 10.1007/s00216-010-3977-0
- [132] Li X-F, Liu W-B, Lu K-L, Xu W-N, Wang Y (2012). Dietary carbohydrate/lipid ratios affect stress, oxidative status and non-specific immune responses of fingerling blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Fish Shellfish Immun* 33: 316-323. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.05.007.
- [133] Kawata K, Osawa M, Okabe S (2009). In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol* 43(15): 6046-6051. DOI: 10.1021/es900754q
- [134] Gagné F, André C, Skirrow R, Gélinas M, Auclair J, van Aggelen G, Turcotte P, Gagnon C (2012). Toxicity of silver nanoparticles to rainbow trout: A toxicogenomic approach. *Chemosphere* 89: 615-622. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.05.063
- [135] Amiard J-C, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbowd PS (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol* 76: 160-202. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.08.015
- [136] Ruttkay-Nedecky B, Nejdil L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T, Stiborova M, Adam V, Kizek R (2013). The role of metallothionein in oxidative stress. *Int J Mol Sci* 14: 6044-6066. DOI: 10.3390/ijms14036044
- [137] Isani G, Carpenè E (2014). Metallothioneins, unconventional proteins from unconventional animals: a long journey from nematodes to mammals. *Biomolecules* 4: 435-457. DOI: 10.3390/biom4020435
- [138] Joo HS, Kalbassi MR, Yu IJ, Lee JH, Johari SA (2013). Bioaccumulation of silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Influence of concentration and salinity. *Aquat Toxicol* 140-141: 398-406. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.07.003
- [139] Massarsky A, Lebarre J, Trudeau VL, Moon TW (2014c). Silver nanoparticles stimulate glycogenolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat Toxicol* 147: 68-75. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.11.026
- [140] Shaluei F, Hedayati A, Jahanbakhshi A, Kolangi H, Fotovat M (2013). Effect of subacute exposure to silver nanoparticle on some hematological and plasma biochemical indices in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Hum Exp Toxicol* 32(12): 1270-1277. DOI: 10.1177/0960327113485258
- [141] Imani M, Halimi M, Khara H (2015). Effects of silver nanoparticles (AgNPs) on hematological parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Clin Pathol* 24: 491-495. DOI: 10.1007/s00580-014-1927-5
- [142] Iwama GK, Vijayan MM, Forsyth RB, Ackerman PA (1999). Heat shock proteins and physiological stress in fish. *Am Zool* 39: 901-909. DOI: 10.1093/icb/39.6.901
- [143] Nelson DL, Cox MM (2005). Lehninger Principles of Biochemistry. 4th ed.; WH Freeman and Co. New York. 2005, 1013 pp.
- [144] Farmen E, Mikkelsen HN, Evensen Ø, Einset J, Heier LS, Rosseland BO, Salbu B, Tollefsen KE, Oughton DH (2012). Acute and sub-lethal effects in juvenile Atlantic salmon exposed to low µg/l concentrations of Ag nanoparticles. *Aquat Toxicol* 108: 78-84. DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.07.007

- [145] Barton B (2002). Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr Comp Biol* 42:517–525. DOI: 10.1093/icb/42.3.517
- [146] Abbott Chalew TE, Galloway JF, Graczyk TK (2012). Pilot study on effects of nanoparticle exposure on *Crassostrea virginica* hemocyte phagocytosis. *Mar Pollut Bull* 64: 2251-2253. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2012.06.026
- [147] Dailianis S, Domouhtsidou GP, Raftopoulou E, Kaloyianni M, V.K. Dimitriadis VK (2003). Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Mar Environ Res* 56: 443-470. DOI: 10.1016/S0141-1136(03)00005-9
- [148] Zuykov M, Pelletier E, Belzile C, Demers S (2011). Alteration of shell nacre micromorphology in blue mussel *Mytilus edulis* after exposure to free-ionic silver and silver nanoparticles. *Chemosphere* 84: 701-706. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.03.02
- [149] Khan MS, Qureshi NA, Jabeen F, Shakeel M, Asghar MS (2017). Assessment of waterborne amine-coated silver nanoparticle (Ag-NP)-induced toxicity in *Labeo rohita* by histological and hematological profiles. *Biol Trace Elem Res*. DOI: 10.1007/s12011-017-1080-5.
- [150] IPCS (International Programme on Chemical Safety) (2002). Chapter 1: executive summary. In: Damstra T, Barlow S, Bergman S, Kavlock R, Van Der Kraak G. (Eds.), Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors - an assessment prepared by an expert group on behalf of the World Health Organization, the International Labour Organization, and The United Nations Environment Programme, pp. 1-3.
- [151] Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek E, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Materials* 8: 543-557.
- [152] Bilberg K, Døving KB, Beedholm K, Baatrup E (2011). Silver nanoparticles disrupt olfaction in Crucian carp (*Carassius carassius*) and Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquat Toxicol* 104: 145-152. DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.04.010
- [153] Pham CH, Yi J, Gu MB (2012). Biomarker gene response in male medaka (*Oryzias latipes*) chronically exposed to silver nanoparticle. *Ecotoxicol Environ Saf* 78: 239-245. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2011.11.034
- [154] Katuli KK, Massarsky A, Hadadi A, Pourmehran Z (2014). Silver nanoparticles inhibit the gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and erythrocyte AChE activities and induce the stress response in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol Environ Saf* 106: 173-180. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.04.001
- [155] Mondon JA, Duda S, Nowak BF (2001). Histological, growth and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* to contaminated marine sediment and diet. *Aquat Toxicol* 54: 231-247. DOI: 10.1016/S0166-445X(01)00146-1
- [156] Burger J, Gaines KF, Shane Boring C, Stephens WL, Snodgrass J, Dixon, C (2002). Metal levels in fish from the Savannah River: Potential hazards to fish and other receptors. *Environ Res* 89: 85-97. DOI: 10.1006/enrs.2002.4330
- [157] Dautremepuits C, Paris-Palacios S, Betoulle S, Vernet G (2004). Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by

- copper and chitosan. *Comp Biochem Physiol* 137C: 325-333. DOI: 10.1016/j.cca.2004.03.005
- [158] Garg S, Gupta RK, Jain KL (2009). Sublethal effects of heavy metals on biochemical composition and their recovery in Indian major carps. *J Hazar Mater* 163: 1369-1384. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.07.118
- [159] Mudry MD, Carballo MA (2006). Genética toxicológica. 1ra ed. De Los Cuatro Vientos, Buenos Aires. 672 pp. ISBNB 987-564-563-X
- [160] Depledge MH, Fossi MC (1994). The role of biomarkers in environmental assessment. *Ecotoxicology* 3: 161-172.
- [161] Canesi L, Ciacci C, Fabbri R, Marcomini A, Pojana G, Gallo G (2012). Bivalve mollusks as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Mar Environ Res* 76: 16-21. DOI: 10.1016/j.marenvres.2011.06.005
- [162] Bonetto AA, Cordiviola de Yuan E, Pignalberi C, Oliveros O (1969). Ciclos hidrológicos del Río Paraná y las poblaciones de peces contenidas en las cuencas temporarias de su valle de inundación. *Physis* 29(78): 213-223.
- [163] FAO (1993). Sinopsis de los datos biológicos y pesqueros del sábalo *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847). Organizaciones de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Sinopsis sobre la pesca 154, 37-40.
- [164] da Silva AOF, Martinez CBR (2014). Acute effects of cadmium on osmoregulation of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: Enzymes activity and plasma ions. *Aquat Toxicol* 156: 161-168. DOI: 10.1016/j.aquatox.2014.08.009
- [165] Santos C, Tempesta de Oliveira M, de Syllos Cólus M, Sofia SH, dos Reis Martinez C (2018). Expression of cyp1a induced by benzo(A)pyrene and related biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Environ Toxicol Phar* 61: 30-37. DOI: 10.1016/j.etap.2018.05.008
- [166] Santos-Silva TG, Montagner CC, Martinez CBR (2018). Evaluation of caffeine effects on biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Environ Toxicol Phar* 58: 237-242. DOI: 10.1016/j.etap.2018.02.002
- [167] Vieira CED, dos Reis Martinez CB (2018). The pyrethroid  $\lambda$ -cyhalothrin induces biochemical, genotoxic, and physiological alterations in the teleost *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 210: 958-967. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.07.115
- [168] CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), (2005). Marco Ético de Referencia para las Investigaciones Biomédicas en Animales de laboratorio, de granja y obtenidos de la naturaleza. Buenos Aires, Argentina. <<http://web.conicet.gov.ar/documents/11716/0/OCR+RD+20050701-1047.pdf>>
- [169] Bacchetta C, Ale A, Simoniello MF, Gervasio S, Davico C, Rossi AS, Desimone MF, Poletta G, López G, Monserrat JM, Cazenave J (2017). Genotoxicity and oxidative stress in fish after a short-term exposure to silver nanoparticles. *Ecol Indic* 76: 230-239. DOI: 10.1016/j.ecolind.2017.01.018
- [170] US EPA (1992). Probit analysis program used for calculating LC/EC values Version 1.5. Ecological Monitoring Research Division. Environmental Monitoring Systems Laboratory US, Cincinnati, OH.
- [171] Parma de Croux MJ (1990). Benzocaine (Ethyl-p-Aminobenzoate) as an anaesthetic for *Prochilodus lineatus*, Valenciennes (Pisces, Curimatidae). *J Appl Ichthyol* 6: 189-192. DOI: 10.1111/j.1439-0426.1990.tb00578.x

- [172] Reichenbach-Klinke HH (1980). Enfermedades de los peces. Acribia, Zaragoza.
- [173] US EPA (1994). Methods for the determination of metals in environmental samples. Cincinnati, OH, USA.
- [174] US EPA (1991). Method 200.3. Sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements in biological tissues. Cincinnati, OH, USA.
- [175] Goede RW, Barton BA (1990). Organismic indices and autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. *Am Fish Soc Symp* 8: 93-108.
- [176] Houston AH (1990). Blood and circulation. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.), *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, MD.
- [177] Cazenave J, Wunderlin DA, Hued A, Bistoni MA (2005a). Hematological characterization of a Neotropical fish, *Corydoras paleatus* (Pisces, Callichthyidae), captured from pristine and polluted water. *Hydrobiologia* 537: 25-33.
- [178] Tavares-Dias M, Ruas de Moraes F (2007). Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphological, cytochemical, and ultrastructural features. *Vet Clin Path* 36: 49-54. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2007.tb00181.x
- [179] Tavares-Dias M, Martins ML, Ruas de Moraes F (2000.) Características hematológicas de teleósteos brasileiros. V. Variáveis do piaçu *Leporinus macrocephalus* Garavello, Britski, 1988 (Anostomidae). *Naturalia* 25: 39-52.
- [180] Marques BF, Cordeiro LF, Kist LW, Bogo MR, López G, Pagano G, Tomazi Muratt D, Machado de Carvalho L, Kulkamp-Guerreiro IC, Monserrat JM (2013). Toxicological effects induced by the nanomaterials fullerene and nanosilver in the polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae) and in the bacteria communities living at the surface. *Mar Environ Res* 89: 53-62. DOI: 10.1016/j.marenvres.2013.05.002
- [181] Bacchetta C, Rossi A, Ale A, Campana M, Parma MJ, Cazenave J (2014). Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach. *Ecol Indic* 36: 532-538. DOI: 10.1016/j.ecolind.2013.09.016
- [182] Misra HP, Fridovich I (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247(10): 3170-3175. PMID: 4623845
- [183] Beutler E (1982). Catalase, in: Beutler, E. (Ed.), *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. Grune and Stratton Inc., New York, 105-106. *Chemosphere* 82: 308-317. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.10.011
- [184] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974). Glutathione S-transferases. The first step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
- [185] Drotar A, Phelps P, Fall R (1985). Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Sci* 42: 35-40. DOI: 10.1016/0168-9452(85)90025-1
- [186] Tanaka K, Sano T, Ishizuka K, Kitta K, Kawamura Y (1994). Comparison of properties of leaf and root glutathione reductases from spinach. *Physiol Plant* 91: 353-358. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1994.tb02960.x
- [187] Amado LL, Garcia ML, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Josencler Luis Ribas Ferreira JLR, Yunes JS, Monserrat JM (2009). A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ* 2115-2123. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.038

- [188] Monserrat JM, Garcia ML, Ventura-Lima J, González M, Ballesteros ML, Miglioranza KSB, Améd MV, Wunderlin DA (2014). Antioxidant, phase II and III responses induced by lipoic acid in the fish *Jenynsia multidentata* (Anablapidae) and its influence on endosulfan accumulation and toxicity. *Pestic Biochem Phys* 108: 8-15. DOI: 10.1016/j.pestbp.2013.10.009
- [189] Yagi K (1976). A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 15(2): 212-216. DOI: 10.1016/0006-2944(76)90049-1
- [190] Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- [191] Rossi A, Bacchetta C, Cazenave J (2017). Effect of thermal stress on metabolic and oxidative stress biomarkers of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae). *Ecol Indic* 79: 361-370. DOI: 10.1016/j.ecolind.2017.04.042
- [192] Trinder P (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 6: 24-27.
- [193] Allain CA, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC (1974). Enzymatic determination of total serum-cholesterol. *Clin Chem* 20(4): 470-475.
- [194] Fossatti P, Prencipe L (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 28: 2077-2080.
- [195] McGowan M, Artis J, Strandbergh D, Zak B (1983). A peroxidase coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem* 29: 538-542.
- [196] Gasbarro L, Bandinelli R, Tomassini G (1972). A new unified biuret reagent stabilized with EDTA. *Clin Chim Acta* 36: 275.
- [197] Seifter S, Dayton S, Novic B, Montwyler E (1950). The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch Biochem* 25: 191-200.
- [198] Folch J, Sloane L, Stanley G (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- [199] Lowry OH, Rosebrough MJ, Far AL, Randall RL (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- [200] Nero V, Farwell A, Lee LEJ, Van Meer T, MacKinnon MD, Dixon DG (2006a). The effects of salinity on naphthenic acid toxicity to yellow perch: Gill and liver histopathology. *Ecotoxicol Environ Saf* 65: 252-264. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2005.07.009
- [201] Nero V, Farwell A, Lister A, Van Der Kraak G, Lee LEJ, Van Meer T, MacKinnon MD, Dixon DG (2006b). Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicol Environ Saf* 63: 365-377. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2005.04.014
- [202] Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhard-Holm P, Wahli T (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J Fish D* 22: 25-34. DOI: 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x
- [203] Sabóia-Moraes SMT, Hernandez-Blazquez FJ, Mota DL, Bittencourt AM (1996). Mucous cell types in the branchial epithelium of the euryhaline fish *Poecilia vivipara*. *J Fish Biol* 49: 545-548. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1996.tb00051.x
- [204] Paulino MG, Benze TP, Sadauskas-Henrique H, Sakuragui MM, Fernandes JB, Fernandes MN (2014). The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a tropical hydroelectric reservoir: bioaccumulation and histopathological

- biomarkers. *Sci Total Environ* 497-498: 293-306. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.07.122
- [205] Reitman S, Frankel F (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic acid transaminase. *Am J Clin Pathol* 28:56-63. PMID: 13458125
- [206] Bacchetta C, Cazenave J, Parma MJ, Bianucci GF (2011). Biochemical stress responses in tissues of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* exposed to a commercial formulation of endosulfan. *Arch Environ Contam Toxicol* 61: 453-460. DOI: 10.1007/s00244-010-9635-x
- [207] Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2015. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina <http://www.infostat.com.ar>
- [208] Farkas J, Christian P, Gallego-Urread JA, Roose N, Hassellövd M, Tollefsen KE, Kevin V. Thomas KV (2011b). Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells. *Aquat Toxicol* 101: 117-125. DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.09.010
- [209] Cazenave J, Wunderlin DA, Bistoni MA, Amé MV b, Krause E, Pflugmacher S, Wiegand C (2005b). Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RRin *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*: A field and laboratory study. *Aquat Toxicol* 75: 178-190. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.08.002
- [210] Martínez M, Wicki G (1997). Guía práctica para el cultivo del pacú (*Piaractus mesopotamicus*). Dirección de Acuicultura, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca y Alimentación de la Nación Argentina.
- [211] Jomori R, Carneiro DJ, Malheiros EB, Portella MC (2003). Growth and survival of pacú *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. *Aquaculture* 221: 277-287. DOI: 10.1016/S0044-8486(03)00069-3
- [212] Garcia F, Pilarski F, Makoto Onaka E, Ruas de Moraes F, Laterça Martins M (2007). Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 271 (1-4): 39-46. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.06.021
- [213] Vaz Farias TH, Levy-Pereira N, de Oliveira Alves L, Carla Dias D, Tachibana L, Pilarski F, de Andrade Belo MA, Tavares Ranzani-Paiva MJ (2016). Probiotic feeding improves the immunity of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* infection. *Anim Feed Sci Tech* 211: 137-144. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2015.11.004
- [214] Zanuzzo FS, Sabioni RE, Montoya LNF, Favero G, Urbinati EC (2017). *Aloe vera* enhances the innate immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after transport stress and combined heat killed *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish Shellfish Immun* 65: 198-205. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.04.013
- [215] Gómez S (1993). Concentración letal de oxígeno disuelto para *Corydoras paleatus* y *Pimelodella laticeps* (Pisces, Siluriformes). *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia* 73:145.
- [216] Gómez S, Cassará S, Brodone S (1994). Producción y comercialización de los peces ornamentales en la República Argentina. *Revista de Ictiología* 2/31320.



- [217] Monserrat JM, Ventura Lima J, RibasFerreira JL, Acosta D, Longaray Garcia M, Baptista Ramos P, Barros T, Moraes Ramos T, Cougodos Santos L, Lund Amado L (2008). Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). *Comp Biochem Phys C* 148(3): 287-292. DOI: 10.1016/j.cbpc.2008.06.011
- [218] Pesce SF, Cazenave J, Monferrán MV, Frede S, Wunderlin DA (2008). Integrated survey on toxic effects of lindane on neotropical fish: *Corydoras paleatus* and *Jenynsia multidentata*. *Environ Pollut* 156(3): 775-783. DOI: 10.1016/j.envpol.2008.06.016
- [219] Britto RS, Longaray Garcia M, Martins da Rocha A, Artigas Flores J, Brant Pinheiro MV, Monserrat JM, Ribas Ferreira JL (2012). Effects of carbon nanomaterials fullerene C60 and fullerol C60(OH)18–22 on gills of fish *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) exposed to ultraviolet radiation. *Aquat Toxicol* 114-115: 80-87. DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.02.018
- [220] Ellman GL (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77.
- [221] Venturino A, Anguiano OL, Gauna L, Cocca C, Bergoc RM, Pechen de D'Angelo AM (2001). Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad *Bufo arenarum*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 130(2): 191-198. DOI: 10.1016/S1532-0456(01)00241-1
- [222] FAO (2004). *Mytilus galloprovincialis*, Programa de información de especies acuáticas. Texto de Figueras, A. En: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma. Actualizado 1 January 2004. [[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus\\_galloprovincialis/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_galloprovincialis/es), en línea, accedido en julio de 2018]
- [223] Gomes T, Pereira CG, Cardoso C, João Bebianno M (2013b). Differential protein expression in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to nano and ionic Ag. *Aquat Toxicol* 136-137: 79-90. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.03.021
- [224] Lowe DM, Soverchia C, Moore MN (1995). Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquat Toxicol* 33: 105-112. DOI: 10.1016/0166-445X(95)00015-V
- [225] Venier P, Maron, S, Canova S (1997). Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene. *Mutat Res* 390 (1/2): 33-44. DOI: 10.1016/S0165-1218(96)00162-0
- [226] Regoli F, Frenzilli G, Bocchetti R, Annarumma F, Scarcelli V, Fattorini D, Nigro M (2004). Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquat Toxicol* 68: 167-178. DOI: 10.1016/j.aquatox.2004.03.011
- [227] Regoli F, Pellegrini D, Winston GW, Gorbi S, Giuliani S, Virno-Lamberti C, Bompadre S (2002). Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Mar Pollut Bull* 44: 912-922.
- [228] Di Giulio RT, Washburn PC, Wenning RJ, Winston GW, Jewell CS (1989). Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. *Environ Toxicol Chem* 8: 1103-1 123.

- [229] Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbri R (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to mediterranean and antarctic mollusks. *Mar Environ Res* 44(1): 69-84.
- [230] Luckenbach T, Epel D (2008). ABCB- and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294(6):1919-1929. DOI: 10.1152/ajpregu.00563.2007
- [231] Taju G, Abdul Majeed S, Nambi KSN, Sahul Hameed AS (2014). In vitro assay for the toxicity of silver nanoparticles using heart and gill cell lines of *Catla catla* and gill cell line of *Labeo rohita*. *Comp Biochem Physiol C* 161: 41-52. *Comp Biochem Physiol C* 161: 41-52.
- [232] Griffitt RJ, Lavelle CM, Kane AS, Denslow ND, Barber DS (2013). Chronic nanoparticulate silver exposure results in tissue accumulation and transcriptomic changes in zebrafish. *Aquat Toxicol* 130-131: 192-200. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.01.010
- [233] Jung Y-J, Kim K-T, Kim JY, Yang S-Y, Lee B-G, Kim SD (2014). Bioconcentration and distribution of silver nanoparticles in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *J Hazard Mater* 267: 206-213. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.12.061
- [234] Handy RD, Henry TB, Scown TM, Johnston BD, Tyler CR (2008b). Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish - a mechanistic analysis. *Ecotoxicology* 17(5) 396-409. DOI: 10.1007/s10646-008-0205-1
- [235] Barron MG, Tarr BD, Hayton WL (1987). Temperature-dependence of cardiac output and regional blood flow in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Biol* 31(6): 735-744. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1987.tb05276.x
- [236] Johari SA, Kalbassi MR, Yu IJ, Lee JH (2015). Chronic effect of waterborne silver nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histopathology and bioaccumulation. *Comp Clin Pathol* 24: 995-1007. DOI: 10.1007/s00580-014-2019-2
- [237] Gaiser BK, Fenandes TF, Jepson M, Lead JR, Tyler CR, Stone V (2009). Assessing exposure, uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles from contaminated environments. *Environ Health-UK* 8(l): S2. DOI: 10.1186/1476-069X-8-S1-S2
- [238] Bergin IL, Witzmann FA (2013). Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps. *Int J Biomed Nanosci Nanotechnol* 3: 1-2. DOI: 10.1504/IJBNN.2013.054515.
- [239] Pretto A, Loro VL, Morsch VM, Silveira Moraes B, Menezes C, Clasen B, Hoehne L, Dressler V (2010). Acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. *Arch Environ Contam Toxicol* 58:1008-1014. DOI: 10.1007/s00244-009-9419-3
- [240] Powers CM, Slotkin TA, Seidler FJ, Badireddy AR, Padilla S (2011). Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating and composition. *Neurotoxicol Teratol* 33(6): 708-714. DOI: 10.1016/j.ntt.2011.02.002
- [241] Chellappa S, Huntingford FA, Strang RGC, Thomson RY (1995). Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *J Fish Biol* 47: 775-787.

- [242] Murray L, Rennie MD, Enders EC, Pleskach K, Martin JD (2017). Effect of nanosilver on cortisol release and morphometrics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem* 36(6): 1606-1613. DOI: 10.1002/etc.3691
- [243] MacKay E, Bergman H (1932). The relation between glycogen and water storage in the liver. *J Biol Chem* 96: 373-380.
- [244] Parma de Croux MJ (1994). Some haematological parameters in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Hydrobiologia Tropical* 27: 113-119.
- [245] Clark NJ, Shaw BJ, Handy RD (2018). Low hazard of silver nanoparticles and silver nitrate to the haematopoietic system of rainbow trout. *Ecotox Environ Saf* 152: 121-131. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.01.030
- [246] Takashima F, Hibiya T (1995). An atlas of fish histology. Normal and pathological features. Kodansha Ltd, Tokio. 192 pp.
- [247] Wilson B, Danilowicz BS, Meijer WG (2008). The diversity of bacterial communities associated with atlantic cod *Gadus morhua*. *Microb Ecol* 55: 425-434. /10.1007/s00248-007-9288-0
- [248] Benhamed S, Guardiola FA, Mars M, Esteban MA (2014). Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes. *Vet Microbiol* 171:1-12. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.03.008
- [249] Merrifield DL, Shaw BJ, Harper GM, Saoud IP, Davies SJ, Handy RD, Henry TB (2013). Ingestion of metal-nanoparticle contaminated food disrupts endogenous microbiota in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Pollut* 174: 157-163. DOI: 10.1016/j.envpol.2012.11.017
- [250] Cordeiro LF, Fell Marques B, Wilges Kist L, Reis Bogo M, López G, Pagano G, Külkamp-Guerreiro IC, Monserrat JM (2014). Toxicity of fullerene and nanosilver nanomaterials against bacteria associated to the body surface of the estuarine worm *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). *Mar Environ Res* 99: 52-59. DOI: 10.1016/j.marenvres.2014.05.011
- [251] Parandhaman T, Das A, Ramalingama B, Samanta D, Sastry TP, Mandal AB, Das SK (2015). Antimicrobial behavior of biosynthesized silica-silver nanocomposite for water disinfection: A mechanistic perspective. *J Hazar Mater* 290: 117-126. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2015.02.061
- [252] Zhang W, Li Y, Niu J, Chen Y (2013). Photogeneration of reactive oxygen species on uncoated silver, gold, nickel, and silicon nanoparticles and their antibacterial effects. *Langmuir* 29: 4647-4651. DOI: 10.1021/la400500t
- [253] Rai RV, Bai JA (2011). Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. In: A. Méndez-Vilas (Ed.), 197-209.
- [254] Bermejo-Nogales A, Fernández M, Fernández-Cruz ML, Navas JM (2016). Effects of a silver nanomaterial on cellular organelles and time course of oxidative stress in a fish cell line (PLHC-1). *Comp Biochem Physiol C* 190: 54-65. DOI: 10.1016/j.cbpc.2016.08.004
- [255] Massarsky A, Dupuis L, Taylor J, Eisa-Beygi S, Strek L, Trudeau VL, Moon TW (2013). Assessment of nanosilver toxicity during zebrafish (*Danio rerio*) development. *Chemosphere* 92: 59-66. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.02.060
- [256] Atli G, Alptekin O, Tükel S, Canli M (2006). Response of catalase activity to Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp Biochem Physiol C* 143: 218-224. DOI: 10.1016/j.cbpc.2006.02.003

- [257] Vignesh V, Anbarasia KF, Karthikeyenia S, Sathiyarayanan G, Subramanian P, Thirumurugan R (2013). A superficial phyto-assisted synthesis of silver nanoparticles and their assessment on hematological and biochemical parameters in *Labeorohita* (Hamilton, 1822). *Colloid Surface A* 439: 184-192. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.04.011
- [258] Begg K, Pankhurst NW (2004). Endocrine and metabolic responses to stress in a laboratory population of the tropical damselfish *Acanthochromis polyacanthus*. *J Fish Biol* 64(1): 133-145. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2004.00290.x
- [259] Johari SA, Kalbassi MR, Soltani M, Yu IJ (2013). Toxicity comparison of colloidal silver nanoparticles in various life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iran J Fish Sci* 12:76-95.
- [260] Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE (2006). Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett* 6(8): 1794-807. DOI: 10.1021/nl061025k
- [261] Monfared AL, Bahrami MA, Hosseini E, Soltani S, Shaddel M (2015). Effects of nanoparticles on histopathological changes of the fish. *J Environ Health Sci* 13:62. DOI: 10.1186/s40201-015-0216-9
- [262] Schreck CB, Tort L, Farrell AP, Brauner CJ (2016). Biology of Stress in Fish. Fish Physiology, vol. 35, 1-590 pp. ISBN: 978-0-12-802728-8
- [263] Pretto A, Loro VLL, Morsch VM, Silveira Moraes B, Menezes C, Santi A, Toni C (2014). Alterations in carbohydrate and protein metabolism in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. *Ecotox Environ Safe* 100: 188-192. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.11.004
- [264] Schlenk D, Benson WH (2001). New Perspectives: toxicology and the environment. Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL.372 pp.
- [265] Shephard KL (1994). Functions for fish mucus, in Reviews in Fish Biology and Fisheries, vol. 4 401-429.
- [266] Shephard KL (1993). Mucus on the epidermis of fish and its influence on drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 11: 403-417.
- [267] Paulino MG, Souza NES, Fernandes MN (2012). Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotox Environ Safe* 80: 6-13. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.02.001
- [268] De Smet H, Blust R (2001). Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Ecotox Environ Safe* 48: 255-262. DOI: 10.1006/eesa.2000.2011
- [269] David M, Mushigeri SB, Shivakumar R, Philip GH (2004). Response of *Cyprinus carpio* (Linn) to sublethal concentration of cypermethrin: alterations in protein metabolic profiles. *Chemosphere* 56: 347-352. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.02.024
- [270] Zhang DL, Liu SY, Zhang J, Zhang JK, Hu CX, Liu YD (2016). Respiratory toxicity of cyanobacterial aphanotoxins from *Aphanizomenon flos-aquae* DC-1 in the zebrafish gill. *Aquat Toxicol* 176: 106-115. DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.04.014
- [271] MacInnes JR, Thurberg FP, Greig RA, Gould E (1977). Long term cadmium stress in the cunner, *Tautoglabrus adspersus*. *Fish B-NOAA* 75: 199-203.

- [272] Beliaeff B, Burgeot T (2002). Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 21: 1316-1322. DOI: 10.1002/etc.5620210629
- [273] Zhao C-M, Wang W-X (2011). Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 30(4): 885-892. DOI: 10.1002/etc.451
- [274] Wood C, Hogstrand C, Galvez F, Munger RS (1996). The physiology of waterborne silver toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 2: The effects of silver thiosulfate. *Aquat Toxicol* 35: 111-125. DOI: 10.1016/0166-445X(96)00004-5
- [275] Ale A, Bacchetta C, Cazenave J (2016). Responses of multiple biomarkers in the fish *Hoplosternum littorale* after exposure to chromium and lead. *Fresen Environ Bull* 25(10): 4052-4059.
- [276] Furman O, Usenko S, Lau BLT (2013). Relative Importance of the humic and fulvic fractions of natural organic matter in the aggregation and deposition of silver nanoparticles. *Environ Sci Technol* 47: 1349-1356. DOI: 10.1021/es303275g
- [277] Johnson WP, Amy GL (1995). Facilitated transport and enhanced desorption of polycyclic aromatic-hydrocarbons by natural organic matter in aquifer sediments. *Environ Sci Technol* 29(3): 807-817. DOI: 10.1021/es00003a032
- [278] Santschi PH, Lenhart JJ, Honeyman BD (1997). Heterogeneous processes affecting trace contaminant distribution in estuaries: The role of natural organic matter. *Mar Chem* 58 (1-2): 99-125. DOI: 10.1016/S0304-4203(97)00029-7
- [279] Kalbitz K, Wennrich R (1998). Mobilization of heavy metals and arsenic in polluted wetland soils and its dependence on dissolved organic matter. *Sci Total Environ* 209(1): 27-39. DOI: 10.1016/S0048-9697(97)00302-1
- [280] Huang WL, Ping PA, Yu ZQ, Fu HM (2003). Effects of organic matter heterogeneity on sorption and desorption of organic contaminants by soils and sediments. *Appl Geochem* 18(7): 955-972. DOI: 10.1016/S0883-2927(02)00205-6
- [281] Steinberg CEW, Saul N, Pietsch K, Meinelt T, Rienau S, Menzel R (2007). Dissolved humic substances facilitate fish life in extreme aquatic environments and have the potential to extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Annal Environ Sci* 1: 81-90.
- [282] Meinelt T, Schreckenbach K, Pietrock M, Heidrich S, Steinberg CEW (2004). Humic substances increase the constitution of swordtail (*Xiphophorus helleri*). *Aquat Sci* 66: 239-245.
- [283] Yin Y, Yang X, Zhou X, Wang W, Yu S, Liu J, Jiang G (2015). Water chemistry controlled aggregation and photo-transformation of silver nanoparticles in environmental waters. *J Environ Sci* 34: 116-125. DOI: 10.1016/j.jes.2015.04.005
- [284] Kim JY, Kim K-T, Lee BG, Lim BJ, Kim SD (2013). Developmental toxicity of Japanese medaka embryos by silver nanoparticles and released ions in the presence of humic acid. *Ecotox Environ Saf* 92: 57-63. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.02.004
- [285] García-Alonso J, Khan FR, Misra SK, Turmaine M, Smith BD, Rainbow PS, Luoma SN, Valsami-Jones E (2011). Cellular internalization of silver nanoparticles in gut epithelia of the estuarine polychaete *Nereis diversicolor*. *Environ Sci Technol* 45: 4630-4636. DOI: 10.1021/es2005122 |
- [286] Lanceleur L, Schäfer J, Chiffolleau J-F, Blanc G, Auger D, Renault S, Baudrimont M, Audry S (2011). Long-term records of cadmium and silver contamination in

- sediments and oysters from the Gironde fluvial-estuarine continuum - Evidence of changing silver sources. *Chemosphere* 85: 1299-1305. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.07.036
- [287] Luoma SN, Ho YB, Bryan GW (1995). Fate, bioavailability and toxicity of silver in estuarine environments. *Mar Pollut Bull* 31: 44-54. DOI:10.1016/0025-326X(95)00081-W
- [288] Osterheld K, Millour M, Pelletier E, Magesky A, Doiron K, Lemarchand K, Gagné J-P (2018). Nanotoxicity of silver: Environmental spill to effects on organisms. Chapter 9, *Environmental Toxicity of Nanomaterials*. 191-240 pp.
- [289] Al-Sid-Cheikh M, Rouleau C, Pelletier E (2013). Tissue distribution and kinetics of dissolved and nanoparticulate silver in Iceland scallop (*Chlamys islandica*). *Mar Environ Res* 86: 21-28. DOI: 10.1016/j.marenvres.2013.02.003
- [290] Gagné F, Auclair J, Turcotte P, Fournier M, Gagnon C, Sauvé S, Blaise C (2008). Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. *Aquatic Toxicology* 86: 333-340. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.02.168
- [291] Rocha TL, Gomes T, Giuliani Durigon E, Bebianno MJ (2016). Subcellular partitioning kinetics, metallothionein response and oxidative damage in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium-based quantum dots. *Sci Tot Environ* 554-555: 130-141. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.02.168
- [292] Faggio C, Tsarpali V, Dailianis S (2018). Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview. *Sci Total Environ* 636: 220-229. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.264
- [293] Langston WJ, Joao Bebianno M, Burt GR (1998). Metal handling strategies in mollusks. *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. W. J. Langston et al. (eds.). London. ISBN 0 412803704
- [294] Georgantzopoulou A, Cambier S, Serchi T, Kruszewski M, Balachandran YL, Grysan P, Audinot J-N, Ziebel J, Guignard C, Gutleb AC, Murk ATJ (2016). Inhibition of multixenobiotic resistance transporters (MXR) by silver nanoparticles and ions in vitro and in *Daphnia magna*. *Sci Total Environ* 569-570: 681-689. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.157
- [295] Higgins CF (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism - an overview. *Res Microbiol* 152: 205-210.
- [296] Vehniäinen E-R, Kukkonen JVK (2014). Multixenobiotic resistance efflux activity in *Daphnia magna* and *Lumbriculus variegatus*. *Chemosphere* 124: 143-149. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.12.014