



**Universitat**  
de les Illes Balears

## **TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

# **ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS MICROPLÁSTICOS MEDIANTE BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN SPARUS AURATA**

**Cristina Sosa Mancera**

**Máster Universitario de Ecología Marina**

**Centro de Estudios de Postgrado**

**Año Académico 2020-21**

# ***Análisis del efecto de microplásticos mediante biomarcadores de estrés oxidativo en Sparus aurata***

**Cristina Sosa Mancera**

**Trabajo de Fin de Máster**

**Centro de Estudios de Postgrado**

**Universidad de las Illes Balears**

**Año Académico 2020-21**

Palabras clave del trabajo:

Biomarcador, Microplásticos, *Sparus aurata*, ROS, Enzimas antioxidantes, Estrés oxidativo, Respuesta inmunitaria, Peroxidación lipídica, Acuicultura

*Tutor del Trabajo Xavier Capó*

## Resumen

Los microplásticos (MPs) se han convertido en una de las grandes preocupaciones de como los desechos de origen antropogénico pueden afectar a los ecosistemas marinos y al bienestar de los organismos que los habitan. Entre los diversos efectos negativos que pueden provocar los MPs se encuentra el estrés oxidativo debido a las especies reactivas del oxígeno (ROS). La metodología utilizada para determinar los efectos de los MPs en los peces a menudo es invasiva, ya que se determina mediante la disección y evaluación de órganos internos como el hígado y el tracto digestivo; lo que hace que sea un inconveniente debido al obligado sacrificio del animal. Recientemente, algunos investigadores han estudiado si los análisis de sangre o plasma podrían ser una alternativa a esta problemática. El objetivo de este estudio ha sido evaluar el efecto de los MPs en el medio marino en hígado, plasma y sangre en la dorada (*Sparus aurata*) mediante enzimas relacionadas con el estrés oxidativo. Se ha evaluado la respuesta de la enzima detoxificadora glutatión s-transferasa (GST), las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), la enzima implicada en la respuesta inflamatoria mieloperoxidasa (MPO), el indicador de peroxidación lipídica malondialdehído (MDA) y la producción de ROS. Los especímenes de *S. aurata* fueron expuestos al medio marino durante 120 días en las instalaciones del LIMIA (Puerto de Andratx, Mallorca). La mayoría de las enzimas analizadas, así como el MDA, presentaron cambios significativos en diferentes tejidos que podrían estar correlacionados con una mayor exposición a MPs debido a un evento inesperado, aunque no se pudo establecer relación entre los biomarcadores y una exposición prolongada a MPs en el tiempo. A falta de un mayor número de estudios, el uso de biomarcadores sanguíneos, especialmente el plasma, podría convertirse en herramienta prometedora para evaluar el efecto de los MPs.

## Abstract

Microplastics (MPs) have become one of the major concerns of how anthropogenic waste can affect marine ecosystems and the organism's welfare that inhabit them. A main negative effect that MPs can cause is oxidative stress due to reactive oxygen species (ROS). The methods used to determine the effects of MPs in fish is often invasive. There are determined by dissecting and evaluating internal organs such as liver and digestive tract, which makes it inconvenient due to the sacrifice of the animal. Recently, some researchers have studied whether blood or plasma tests can solve this problem. The objective of this study was to evaluate the effect of MPs on liver, plasma and blood in gilthead seabream (*Sparus aurata*) in marine environment by the evaluation of enzymes related to the metabolism of ROS. It has been analyzed the response of the detoxifying enzyme glutathione s-transferase (GST), the antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), the enzyme involved in the inflammatory response myeloperoxidase (MPO), the indicator of lipid peroxidation malondialdehyde (MDA) and ROS production. *S. aurata* specimens were exposed to the marine environment for 120 days at the LIMIA facilities (Puerto de Andratx, Mallorca). Most of the enzymes analyzed, as well as MDA, presented significant changes in different tissues that could be correlated with a greater exposure to MPs due to an unexpected event, although no relationship could be established between biomarkers and a prolonged exposure to MPs in time. In the absence of a greater number of studies, the use of blood biomarkers, especially plasma, could become a promising tool to evaluate the effect of MPs.

# Índice

1. Introducción.....	5
2. Objetivos .....	9
3. Materiales y métodos.....	10
3.1. Procedimiento experimental.....	10
3.2. Muestreo.....	10
3.3. Análisis de la ingesta de microplásticos.....	12
3.4. Determinación de los plastificantes.....	12
3.5. Preparación de las muestras para el análisis bioquímico.....	13
3.6. Análisis bioquímico.....	13
3.6.1. Contenido proteico .....	13
3.6.2. Actividad enzimática.....	13
3.6.2.1. Glutación S-transferasa (GST).....	13
3.6.2.2. Enzimas antioxidantes: Catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) .....	13
3.6.2.3. Mieloperoxidasa (MPO).....	14
3.6.2.4. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	14
3.6.2.5. Malondialdehído (MDA).....	14
3.7. Análisis estadístico .....	14
4. Resultados .....	15
4.1. Biometría.....	15
4.2. Análisis de la ingesta de microplásticos.....	16
4.3. Determinación de plastificantes .....	16
4.4. Actividad enzimática.....	17
4.4.1. Glutación S-transferasa .....	17
4.4.2. Catalasa .....	17
4.4.3. Superóxido dismutasa.....	18
4.4.4. Mieloperoxidasa .....	19
4.5. Especies reactivas del oxígeno .....	19
4.6. Malondialdehído.....	20
5. Discusión.....	21
6. Conclusiones .....	25
7. Bibliografía.....	26

## 1. Introducción

En los últimos años, ha surgido una gran concienciación de como la acción del ser humano ha afectado al medio ambiente, pero recientemente se ha posicionado como una de las grandes problemáticas a nivel ecológico el gran aumento y acumulación de plásticos que se han detectado en los medios acuáticos. El plástico compone entre un 80-85% de la basura encontrada en los océanos (Auta *et al.*, 2017), considerándose una de la más problemática por su cantidad y persistencia (GESAMP, 2015).

El plástico es un material formado por polímeros sintéticos que, debido a su alta maleabilidad, fácil fabricación y bajo coste de producción, se ha extendido su uso en una gran variedad de aplicaciones en diferentes sectores. Una gran cantidad de estos plásticos son muy utilizados en envases de un solo uso que al desecharse sin control y sumado a una mala gestión de éstos, han originado gigantescos basureros marinos. En los últimos 50 años el consumo de plásticos ha aumentado exponencialmente, en 1970 se producían aproximadamente 50 toneladas mientras que en 2019 son cerca de 370 toneladas (Plastics Europe, 2020).

El tamaño de los plásticos puede variar dependiendo del propósito para el que fueran fabricados, desde piezas gigantescas hasta fragmentos de tamaño microscópico. Los microplásticos (MPs) se definen como aquellos fragmentos de plástico con un diámetro menor de 5 mm. Dependiendo de su origen podemos encontrar MPs de dos tipos: los primarios, aquellos que fueron fabricados originalmente en este tamaño; y secundarios, derivados de la degradación de piezas más grandes a través de la fotodegradación y otros procesos de meteorización como el oleaje y la temperatura (Wright *et al.*, 2013). Los polímeros sintéticos más abundantes debido a esos procesos son el polipropileno (PP), polietileno (PE), poliestireno (PS), cloruro de polivinilo (PVC) y tereftalato de polietileno (PET) (Rocha-Santos & Duarte, 2015).

Los microplásticos se dispersan a lo largo del medio marino gracias al viento, las corrientes y las mareas, convergiendo en los giros subtropicales, llegando a formar islas de plástico de varias hectáreas. A su vez, la acumulación de contaminación plástica también ocurre en bahías cerradas, golfos y mares rodeados por costas y cuencas hidrográficas densamente pobladas, llegando a sedimentar en el fondo marino. En la revisión de los estudios sobre la detección de microplásticos, Santillo *et al.* (2017) y Jovanović (2017) afirman que, aunque aún no se han armonizado los métodos de detección y medición (EFSA, 2016; Peng *et al.*, 2017), se pueden encontrar estos componentes en organismos marinos desde en aguas de Indonesia y Estados Unidos hasta Portugal, España, Atlántico Norte, Mar del Norte y Báltico, así como el Mediterráneo central.

El Mar Mediterráneo es considerado una de las zonas que podría estar más afectadas por la acumulación de MPs (Pham *et al.*, 2014). A lo largo de la costa mediterránea encontramos multitud de destinos turísticos que generan una gran cantidad de basura, especialmente en época

estival, y que, debido a una ineficiencia a la hora de procesar estos vertidos generados por el repunte de población, suelen ser abocados al mar sin ser tratados (Expósito *et al.*, 2021). A esto le podemos agregar un gran número de ríos que funcionan como cintas transportadoras de basuras provenientes del continente hacia el mar; por ejemplo, se estima que el río Ebro vierte cerca de 2200 millones de MPs al año (Simon-Sánchez *et al.*, 2019). Por otra parte, se trata de un mar semi-cerrado ya que solo se encuentra conectado por otras masas de agua por el estrecho de Gibraltar y el canal de Suez, siendo su tasa de renovación de agua es muy baja, cerca de 90 años, lo que provoca que los ecosistemas mediterráneos sean muy susceptibles a la contaminación de productos tóxicos que se acumulan gradualmente (Deudero & Alomar, 2015). Es complejo estimar la cantidad total de microplásticos en el Mar Mediterráneo, pero se estima entre las 4.800 y las 30.300 toneladas (Van Sebille *et al.*, 2015).

Algunos estudios señalan que el gran desarrollo y demanda de la acuicultura podría ser una fuente creciente para la contaminación de plásticos (Lusher *et al.*, 2017; Krüger *et al.*, 2020), por ejemplo, en 2016 la demanda de productos marinos ascendió a 110,2 millones de toneladas (Krüger *et al.*, 2020). Gran parte de las instalaciones y plantas de esta industria se encuentran en mar abierto, salobres y aguas costeras; que utilizan aparejos fabricados con fibras sintéticas y materiales derivados del plástico (Lusher *et al.*, 2017). En algunas ocasiones, estos utensilios se esparcen en el medio marino debido a roturas, pérdidas, descomposición o falta de mantenimiento; por lo que estos plásticos se incorporarían al medio marino (Lusher *et al.*, 2017). Por otro lado, el plástico es utilizado en el empaquetado del pescado, las jaulas y tanques para peces, transporte, etc. (GESAMP, 2015).

A lo largo de los últimos años se ha documentado ampliamente la presencia de microplásticos en múltiples tejidos de especies acuáticas con gran importancia tanto ecológica como comercial, desde zooplancton (Botterell *et al.*, 2019), moluscos (Avio *et al.*, 2015; Digka *et al.*, 2018), peces (Digka *et al.*, 2018; Compa *et al.*, 2018), reptiles (Domenech *et al.*, 2019), mamíferos (Fossi *et al.*, 2016) hasta especies en peligro de extinción (Deudero & Alomar, 2016).

El daño potencial que pueden provocar los MPs está relacionado con las propiedades físicas, con respecto a la interacción de las partículas con los tejidos del organismo; y con las propiedades químicas, con respecto a la transferencia de contaminantes o lixiviación de aditivos plásticos (Rochman *et al.*, 2013; Pedà *et al.*, 2016). De hecho, los plásticos, debido a su naturaleza lipofílica y a la adición en su fabricación de aditivos como los ftalatos o bisfenoles, tienen el potencial de adsorber contaminantes orgánicos persistentes (COP) de carácter hidrófobo; también pueden contener u absorber plaguicidas organoclorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), bifenilos policlorados (PCB), difeniléteres polibromados (PBDE), estireno, disolventes y metales tóxicos (Teuten *et al.*, 2009; Ashton *et al.*, 2010; Rochman *et al.*, 2013) que pueden aumentar su efecto nocivo sobre la biota (Koelmans *et al.*, 2014; Barboza *et al.*, 2018). Por otro lado, si bien hace falta un mayor número de estudios, existe la posibilidad de que los MPs se transfieran entre los diferentes eslabones de la cadena trófica ya que esto podría explicar las altas

concentraciones de MPs encontradas en grandes peces pelágicos (Romeo *et al.*, 2015; Yokota *et al.*, 2017)

Los plastificantes son aditivos incorporados en la fabricación de plásticos con objetivo de proporcionarle diferentes características como flexibilidad, durabilidad o suavidad, entre otras. Recientemente, ha surgido la preocupación de que algunos de estos aditivos, mayormente ftalatos como el di-n-butil ftalato (DBP) o el dietilftalato (DEP), puedan provocar por sí mismos efectos perjudiciales como estrés oxidativo o disrupción endocrina en la biota marina (Aoki *et al.*, 2011; Oehlmann *et al.*, 2008). Algunos de estos compuestos se encuentran prohibidos o estrictamente regulados, como el DBP, prohibido en juguetes y cosméticos (Directiva europea 2005/84/CE, Directiva 76/769/CEE) pues se considera cancerígeno y mutagénico; aun así, muchos de los productos plásticos manufacturados en el pasado con estos aditivos acabaron en el medio marino.

Las observaciones histológicas en peces expuestos confirmaron que los MP, una vez ingeridos, pueden retenerse en órganos diana como las branquias y el tracto digestivo, e incluso, trasladarse a otros tejidos corporales (Browne *et al.*, 2008; Von Moos *et al.*, 2012). Este proceso induce una fuerte respuesta inflamatoria en varios tejidos, especialmente en el hígado (Limonta *et al.*, 2019) provocando estrés oxidativo y alteración del metabolismo de lípidos (Lu *et al.*, 2016). Otros efectos detectados son alteraciones del comportamiento, reducción del rendimiento depredador, neurotoxicidad, disminución del crecimiento (Rochman *et al.*, 2013; Rochman *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2016; Pedà *et al.*, 2016; Barboza *et al.*, 2018). Por lo tanto, la interacción entre los MP y estos productos químicos puede estar relacionada con una amplia gama de efectos subletales en los organismos tras la ingestión (Koelmans *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2016; Pedà *et al.*, 2016).

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son generalmente moléculas pequeñas altamente inestables que se obtienen como subproducto en la reducción de oxígeno y en el proceso de detoxificación de sustancias. Las ROS son moduladores cruciales de las funciones celulares; en bajas concentraciones son compuestos esenciales en la señalización celular y la defensa contra agentes infecciosos, pero en exceso puede alterar la función celular normal. Entre algunos de los efectos perjudiciales encontramos la activación procesos de peroxidación lipídica dañando la membrana celular y el daño a proteínas celulares claves en el metabolismo que pueden llegar a afectar al ADN, así como desencadenar respuestas inflamatorias y la apoptosis.

La exposición a diferentes contaminantes como los MPs puede inducir estrés oxidativo (Alomar *et al.*, 2017; de Sá *et al.*, 2018); debido a un exceso de ROS, se produce un desequilibrio entre la generación y la neutralización estos compuestos que desemboca a que las células mermen su capacidad para procesar los reactivos intermedios y reparar el daño resultante (Lushchak, 2011).

Para sobrellevar los efectos del estrés oxidativo, los peces tienen un intrincado sistema antioxidante que procede a acelerar ciertas reacciones restando especies reactivas del organismo e inhibe otras reacciones de oxidación oxidando agentes reductores como tioles o polifenoles. Entre las enzimas que comprenden este sistema encontramos catalasa (CAT), enzima encargada de descomponer el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y oxígeno molecular, y la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la dismutación de radicales superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Estas actúan de forma conjunta con la glutatión S-transferasa (GST) (Sayed & Soliman, 2018; Soliman *et al.*, 2019), una isoenzima multifuncional implicada en la detoxificación celular de compuestos electrofílicos entre los que se encuentran las ROS y otros productos generados por daños celulares. Esta enzima cataliza la conjugación del glutatión endógeno con xenobióticos incrementando la solubilidad del compuesto electrofílico pudiendo facilitar su excreción del organismo.

A su vez, se puede llegar a desencadenar una reacción del sistema inmunitario innato. La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima presente en las células de este sistema que es secretada al plasma después de una infección o en presencia de una respuesta inflamatoria, la cual utiliza  $H_2O_2$  como sustrato para generar el ácido hipocloroso (Sureda *et al.*, 2005).

Por otro lado, el malondialdehído (MDA) es un componente orgánico que se produce como resultado de la peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados debido al estrés oxidativo por ROS. La cuantificación de MDA nos permite valorar el grado de esta reacción en las células.

La inducción de enzimas antioxidantes y la elevación de la peroxidación lipídica en peces expuestos a diferentes contaminantes pueden considerarse bioindicadores de estrés oxidativo (Karami *et al.*, 2016). Los peces con un apetito voraz, una buena densidad poblacional y que puedan ser fácilmente capturados o criados son ideales en la evaluación de ecosistemas acuáticos.

La dorada (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) es un espárido que se encuentra generalmente distribuido a lo largo del Mar Mediterráneo y parte del Atlántico oriental, siendo una de las especies de mayor importancia comercial dentro de la pesca y la acuicultura marina.

La producción en criadero y el cultivo de la dorada es una de las historias de éxito del negocio de la acuicultura debido a la alta adaptabilidad a las condiciones tanto de cría intensiva como extensiva, aumentando su producción anual regularmente, siendo su mayor pico en el año 2000 con 87000 toneladas (FAO, 2021). Su disponibilidad e importancia comercial ha llevado a utilizar la dorada como especie modelo. Diversos estudios han demostrado su idoneidad como bioindicador en investigaciones basadas en bioacumulación (Grigorakis, 2007; Koven *et al.*, 2001) y en pruebas de toxicidad (Espinosa *et al.*, 2017; Teles *et al.*, 2005; Zena *et al.*, 2015), así como el aumento de enzimas antioxidantes en el intestino después de 3 meses bajo la exposición continua de MP (Solomando *et al.*, 2020).



La preocupación por el impacto que puedan tener los MPs sobre la biota ha llevado a desarrollar diversos estudios, sin embargo, aún existen lagunas sobre el potencial toxicológico en periodos largos de tiempo, así como pueden llegar a afectar a otros órganos o sistemas en los organismos, como por ejemplo en la sangre y plasma en peces.

## 2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio es determinar los efectos deletéreos de la ingesta de microplásticos en hígado. También se pretende analizar si los MPs pueden alterar los biomarcadores de estrés oxidativo en plasma o sangre, con el objetivo de desarrollar una metodología menos invasiva. Se evaluará la respuesta de diferentes biomarcadores a la ingesta de MPs en un medio marino natural por un periodo de 120 días en hígado, plasma y sangre en doradas. Los resultados se compararán con la ingesta de microplásticos y con la presencia de plastificantes en el hígado.

Una vez concretado el objetivo general, se plantearon los objetivos específicos siguientes:

- Determinar el estado nutricional de los a través del cálculo del Índice de Condición (CI)
- Determinar la respuesta antioxidante de CAT y SOD en hígado, plasma y sangre en *S. aurata* debido al estrés oxidativo y la actividad detoxificante de la enzima GST en hígado.
- Analizar si se produce un incremento en la actividad inmunitaria e inflamatoria mediante los niveles de MPO en los diferentes tejidos en doradas.
- Examinar el daño oxidativo celular por peroxidación lipídica de los especímenes mediante la observación de los niveles de MDA en hígado, plasma y sangre.

La hipótesis que planteamos bajo estos objetivos específicos es que la ingesta y acumulación progresiva de MPs durante un periodo de 120 días provocara una mayor respuesta de las enzimas y la peroxidación lipídica en respuesta al estrés oxidativo.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Procedimiento experimental

El presente estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuicultura (LIMIA) en la bahía de Andratx en Mallorca (39°32'38.13" N, 2°22'51.08" E). La especie elegida para el estudio fue *S. aurata*. Los alevines de dorada proporcionados por Instituto Español de Oceanografía de Murcia (España) fueron criados hasta alcanzar la edad adulta en condiciones estables y controladas dentro del LIMIA. El agua utilizada en los tanques de cría proveniente del puerto fue filtrada, tanto en su salida como en su entrada del establecimiento, con un filtro de carbón y esterilizada con UV, evitando así los posibles contaminantes suspendidos. Los peces fueron alimentados diariamente con una combinación de gránulos secos comerciales (Optibream D-6) gracias a un alimentador automático cada 12 horas. La cantidad de alimento varió en función de la biomasa del total de los especímenes (entre 50 y 75 g de alimento).

Una vez que las doradas llegaron al estadio adulto fueron trasladadas a 3 jaulas de acuicultura circulares (5,5 m de diámetro) en el exterior, separadas entre ellas en más de 2 m para evitar una proximidad que induzca a pseudo-replicación. Por cada jaula se instalaron 100 especímenes de *S. aurata* en redes a 10-15 m de profundidad, y de igual manera que con los juveniles, fueron alimentados con pienso (Optibream D-6) cada 12 horas con un alimentador automático dependiendo de su biomasa total (entre 250 y 500 g de alimento).

#### 3.2. Muestreo

Para poder analizar el efecto de los MPs del medio marino sobre el estado oxidativo e inflamatorio se procedió a recoger muestras de sangre plasma e hígado en 3 tiempos cada dos meses (los nombraremos T<sub>0</sub>, T<sub>60</sub> y T<sub>120</sub>). El muestreo inicial (T<sub>0</sub>) se realizó 4 semanas después del acondicionamiento de los especímenes al medio natural. Antes de cada muestreo, los peces no fueron alimentados el día anterior, pero los peces podrían alimentarse del medio ambiente.

Se utilizaron un total de 45 individuos, de los cuales 15 fueron medidos y sacrificados por cada tiempo. Los ejemplares se anestesiaron con metanosulfonato de triclaína/MS-222 (1 g en 10 L de agua) bajo protocolos estandarizados y validados (Lusher *et al.*, 2013) y se procedió a registrar la longitud y el peso total. Una vez tomadas las medidas biométricas pertinentes se procedió al muestreo de diferentes tejidos. La sangre se extrajo con una jeringa de 1 mL a través del seno caudal y transferida a un tubo Eppendorf que se centrifugaron inmediatamente (1700 g, durante 15 min, 18; Orto Alresa® Biocen 22R) para obtener plasma y eritrocitos. Se mantuvieron a -80°C hasta el análisis bioquímico en el laboratorio.

Una vez finalizada la extracción de sangre, se sacrificaron los individuos y se diseccionó el hígado y el aparato digestivo abriendo la cavidad abdominal (Figura 1); el aparato digestivo fue utilizada para determinar la ingesta de MPs en otro estudio. Las muestras fueron dispuestas en

tubos Eppendorf y almacenadas, inicialmente, en nitrógeno líquido, y más tarde a -80°C hasta el análisis bioquímico.

Con el fin de estimar el estado general de salud y aptitud de los peces, se calculó el índice de condición (CI) basándose en datos de talla-peso y siguiendo la ecuación de Fulton (1902):

$$CI = \frac{W}{L^3} \times 100$$

Donde W es el peso (g) y L la longitud (cm).

El protocolo establecido por el LIMIA para el cuidado, manipulación y muestreo de los ejemplares de *S.aurata* cumple estrictamente las recomendaciones de la Directiva 2010/63/UE, y legislación española (RD53/2013, BOE n°34 de 8 de febrero de 2013). Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de las Islas Baleares (Referencia CEEA 96/05/18).

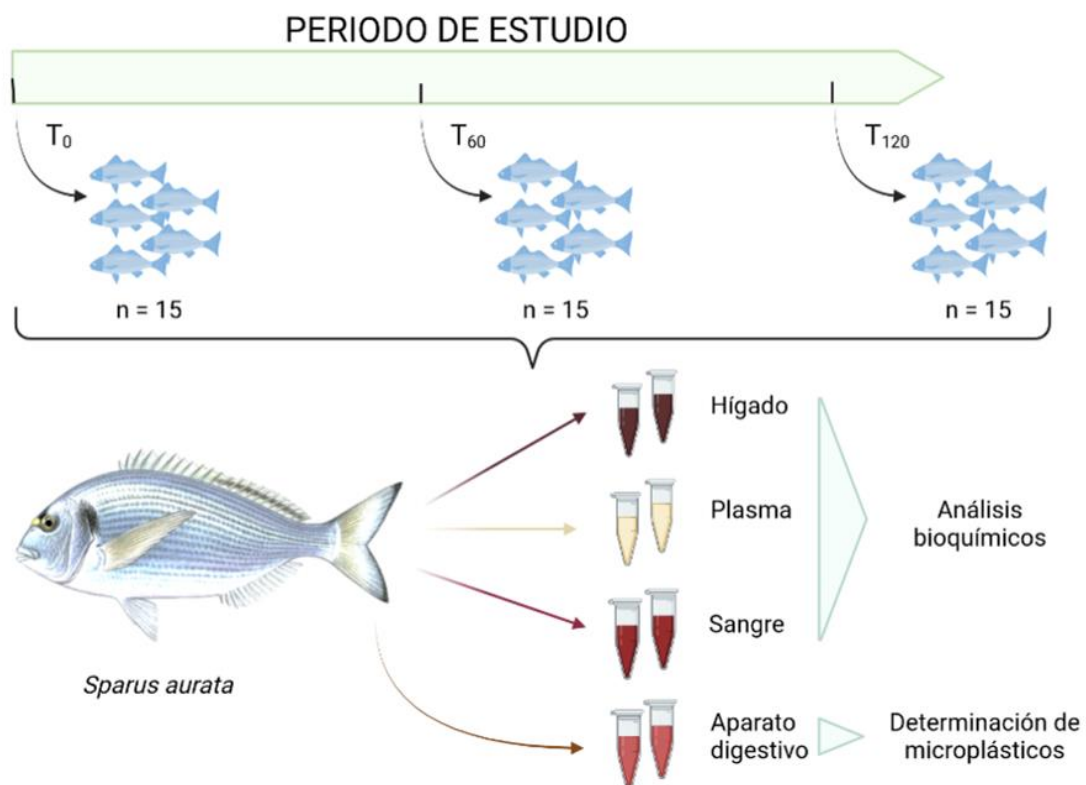


Figura 1. Esquema del muestreo de *Sparus aurata* en el presente estudio. en los diferentes tiempos. En la parte superior se representa los especímenes muestreados (n=15) cada 60 días. En la parte inferior se presentan los tejidos extraídos de cada individuo para su análisis determinado.

### 3.3. Análisis de la ingesta de microplásticos

Para comprobar la ingestión de MP en los ejemplares de *S. aurata* durante el estudio, se analizaron los tractos gastrointestinales de los peces. Para ello, los MPs se aislaron y extrajeron mediante la aplicación de hidróxido de potasio (KOH) al 10% (20 ml de KOH por gramo de muestra) durante 48 horas (Dehaut *et al.*, 2016). Una vez que el KOH disuelve el contenido orgánico sin degradar los MPs presentes en las muestras (Foekema *et al.*, 2013; Dehaut *et al.*, 2016), éstas se filtraron con filtros de membrana de policarbonato (FILTER-LAB, tamaño de poro 20.0  $\mu\text{m}$ , diámetro 47 mm).

Los filtros fueron inspeccionados con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Euromex NZ1903-S) para identificar MP ingeridos en el tracto gastrointestinal de los individuos. Datos como color, la longitud máxima y la tipología fueron registrados para su posterior análisis.

Para evitar la contaminación externa por MPs durante el procedimiento, se utilizaron batas de laboratorio (100% algodón) y guantes. Todo el material utilizado y las superficies de trabajo se sellaron dos veces antes de utilizarlo con agua destilada y etanol 70%. La ausencia de contaminación durante el análisis de la ingesta fue comprobada mediante la colocación de dos placas de Petri de vidrio a cada lado del estereomicroscopio y se verificó la ausencia de MP antes y después de cada muestra.

### 3.4. Determinación de los plastificantes

Las muestras de hígado fueron lavadas con diclorometano, filtradas con un filtro metálico de 50  $\mu\text{m}$ , y lavadas de nuevo con agua MiliQ. Posteriormente, se sometieron a un tratamiento de MSPD, en el que se hacen pasar por el cartucho, primero ACN y después una mezcla de ACN/MetOH (70/30). El eluato se lleva a evaporación y se reconstituye la muestra empleando una mezcla ACN/H<sub>2</sub>O (45/55). Una alícuota de la muestra reconstituida se analizó en el HPLC/DAD y MS por triplicado.

La separación cromatográfica de los plastificantes se llevó a cabo con el equipo de cromatografía líquida de Agilent Technologies® (modelo 1260) y columna ACE-1210-1546 (150 x 4,6 mm) acoplado a un equipo de espectrometría de masas Agilent Technologies® (modelo 6100). La fase móvil utilizada fue una mezcla de acetonitrilo (disolvente A) y agua ultrapura Mili-Q (disolvente B), ambos con una concentración de 0.1% de ácido acético. El gradiente programado fue de 0 a 30 min, 45% A y 55% B, 30-31 min, 80% A y 20% B y finalmente 100% B durante 9 min. El flujo de la fase móvil se fijó en 0,8 mL min<sup>-1</sup>, siendo la inyección del volumen de muestra de 400  $\mu\text{L}$  y la longitud de onda de detección de 210 nm para todos los analitos. A continuación, se realizó la espectrometría de masas en modo de ionización positiva usando ESI (presión de nebulizador de 60 psig, 350°C, 5000 V y una ganancia de 2 para todos los compuestos).

### 3.5. Preparación de las muestras para el análisis bioquímico

Con el fin de analizar los efectos de los MPs en el estrés oxidativo en condiciones naturales, se analizaron un total de 45 de muestras de cada tejido (hígado, plasma y sangre) de la especie *S. aurata* (n=15 por tiempo). Se tomaron entre 0,1 y 0,2 gramos de muestra de hígado y se homogeneizaron en 10 volúmenes (peso/volumen) de tampón Tris-HCl (100 mM a pH=7,5) utilizando un homogeneizador de aspas (Ultra-Turrax<sup>®</sup> Disperser). A continuación, las muestras se centrifugaron (5000 g, durante 10 min, 4°C), se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron en frío (-80°C) (Sureda *et al.*, 2006).

### 3.6. Análisis bioquímico

#### 3.6.1. Contenido proteico

El contenido de proteína total de las muestras fue determinado mediante el método de Bradford. Esta técnica se basa en el cambio de color del reactivo Coomassie Blue (Bio-Rad<sup>®</sup>) frente a una determinada concentración de proteínas ya que se une a los aminoácidos básicos y aromáticos. La lectura se realizó a una absorbancia de 595 nm (BioTek<sup>®</sup>, PowerWaveXS). La recta patrón se realizó mediante diluciones seriadas de albumina de suero bovino (BSA). El contenido de proteína total se utilizó como estándar para normalizar todos los datos bioquímicos.

#### 3.6.2. Actividad enzimática

##### 3.6.2.1. Glutación S-transferasa (GST)

Para calcular la actividad de la GST, se utilizó el reactivo 1-cloro, 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) que por acción de la GST forma un complejo estable con el glutati6n (Habig *et al.*, 1974). La formaci6n de este complejo se monitoriz6 leyendo la absorbancia a 340 nm en el espectrofot6metro (Shimadzu UV-2100 spectrophotometer a 25°C). Esta prueba solo se realiz6 en el h6gado.

##### 3.6.2.2. Enzimas antioxidantes: Catalasa (CAT) y super6xido dismutasa (SOD)

Para su cuantificaci6n se introdujo tamp6n fosfato (50 mM a pH=7) y la muestra correspondiente en una cubeta, y justo antes de realizar la lectura en el espectrofot6metro, se a6adi6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> agitando la mezcla por inversi6n. Se calcul6 la actividad de la enzima midiendo el descenso en la absorbancia correspondiente a la desaparici6n del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm (Aebi, 1984).

Para la cuantificaci6n de SOD se introdujo tamp6n fosfato pot6sico 50 mM, la muestra correspondiente y xantina oxidasa en una cubeta; a su vez tambi6n se realizaron varios blancos (reacci6n sin muestra). La mezcla se agit6 por inversi6n y se procedi6 a la lectura de la absorbancia a 550 nm (Flohe & 6tting, 1984). Estos reactivos inducen a la formaci6n de an6n super6xido, el cual produce la reducci6n del citocromo C. Los valores obtenidos se compararán

con el valor del blanco; la diferencia corresponderá a la capacidad de la SOD para descomponer los radicales superóxido.

### 3.6.2.3. *Mieloperoxidasa (MPO)*

Para esta prueba se introdujo en las cubetas junto a la muestra, tampón fosfato (20 mM, pH=7), guaiacol (2-metoxifenol), y finalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El guaiacol actúa como un portador de electrones, siendo oxidado y reducido por el sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de un ion haluro (Capeillère-Blandin, 1998). Se calculó la actividad de la enzima midiendo ascenso en la absorbancia a 470 nm (Shimadzu UV-2100 spectrophotometer). Esta enzima podría usarse como bioindicador de activación e inflamación del sistema inmunológico frente a la contaminación plástica (Chen *et al.*, 2019).

### 3.6.2.4. *Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)*

La generación de ROS se midió en el hígado usando 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA) como indicador. Se añadió DCFH-DA (30 µg/ml) en PBS a una microplaca de 96 pocillos que contenía las muestras homogeneizadas y se registró la fluorescencia (Ex, 480 nm; Em, 530 nm) a 25°C durante una hora en (BioTek®, PowerWaveXS). La DCFH-DA es un marcador inicialmente no fluorescente permeable a las células, que una vez en su interior, se convierte en un compuesto más polar por la acción de las esterasas intracelulares, la 2',7'-diclorofluoresceína, la cual es fluorescente cuando es oxidada. Esta prueba solo se realizó en hígado y sangre.

### 3.6.2.5. *Malondialdehído (MDA)*

Su determinación se realizó mediante la adición a las muestras de los reactivos 1-metil 2-fenilindol, acidonitrilo:metanol (3:1), y HCl (12N); las muestras se incubaron durante 1 hora a 45°C (Pinya *et al.*, 2016; Sureda *et al.*, 2018). El MDA derivatiza con el 1-metil-2-fenilindol para producir un cromóforo estable, el cual se pudo leer a 586 nm (BioTek®, PowerWaveXS). El MDA se cuantificó mediante la comparación de una curva patrón de concentración conocida.

## 3.7. Análisis estadístico

La finalidad de este análisis es evaluar si las respuestas de los biomarcadores analizados muestran diferencias significativas a lo largo del tiempo de exposición a un entorno natural. Por tanto, se analizó si el factor fijo, el tiempo de exposición (con 3 niveles: T<sub>0</sub>, T<sub>60</sub> y T<sub>120</sub>), producía algún efecto sobre las variables respuestas correspondientes a los valores continuos de cada una de las actividades enzimáticas (CAT, SOD, y GST), producción de ROS, peroxidación lipídica (MDA) e inflamación (MPO) que han sido determinadas en los individuos.

Para ello primero se comprobó la normalidad de distribución e igualdad de varianza mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Levene (con las librerías *car* y *carData*), respectivamente.

Si el biomarcador seguía una distribución normal, se prosiguió con un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. En aquellas distribuciones que no se cumplieron los requisitos de homocedasticidad y normalidad para el ANOVA, se procedió a realizar un modelo lineal mixto generalizado (GLM) con distribución gamma. Posteriormente, se compararon las medias de los diferentes biomarcadores con un test post hoc (*Tukey*) para determinar las diferencias significativas entre los tiempos de muestreo.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el software estadístico libre R (versión 4.1.0) y la extensión RStudio (versión 1.4.1717). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (S.E.M.) y las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1. Biometría

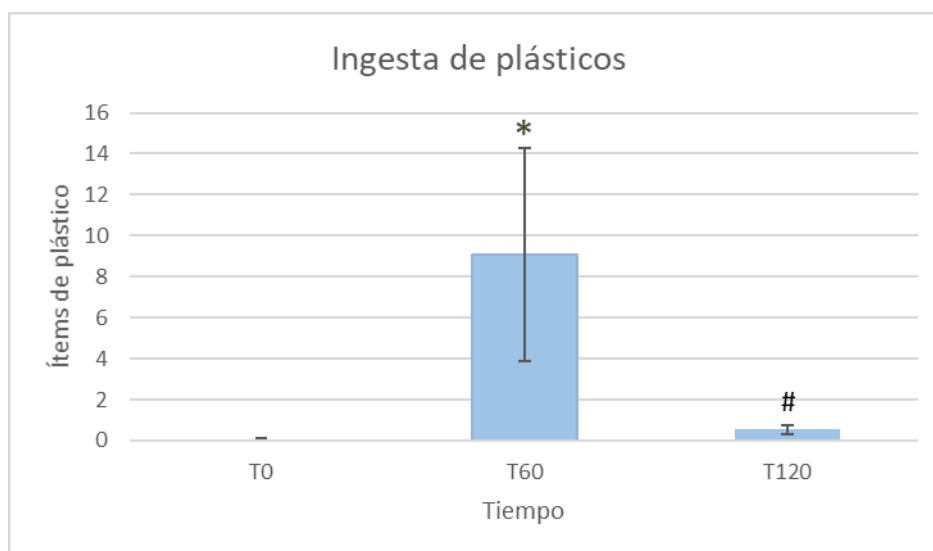
En la Tabla 1 se representa la media tanto de la talla como del peso de los especímenes de *S. aurata* a lo largo del estudio, así como el Índice de Condición (CI). La talla media de los especímenes fue creciendo progresivamente hasta alcanzar su valor máximo en el muestreo final ( $20.25 \pm 0.348$  cm), al igual que el peso ( $216.3 \pm 11.57$  g). La talla (ANOVA,  $F_{2,45}=41.11$ ,  $p < 0,001$ ) y el peso (ANOVA,  $F_{2,45}=31.39$ ,  $p < 0,001$ ) mostraron diferencias significativas a lo largo del periodo de estudio. Los resultados obtenidos en el test post hoc (*Tukey*) mostraron diferencias significativas en talla entre los tres muestreos  $T_0$  ( $16.47 \pm 0.298$  cm),  $T_{60}$  ( $18.87 \pm 0.239$  cm) y  $T_{120}$  ( $20.25 \pm 0.348$  cm). En peso también se encontraron diferencias entre los tiempos  $T_0$  ( $119.6 \pm 7.052$  g),  $T_{60}$  ( $170.9 \pm 6.337$  g) y  $T_{120}$  ( $216.3 \pm 11.57$  g). El test El CI se evaluó con el test ANOVA, pero no se obtuvo ninguna diferencia significativa entre los niveles de Tiempo.

	Talla (cm)	Peso (g)	Índice de Condición
$T_0$	$16.47 \pm 0.298$	$119.6 \pm 7.052$	$2.631 \pm 0.038$
$T_{60}$	$18.87 \pm 0.239^*$	$170.9 \pm 6.337^*$	$2.534 \pm 0.047$
$T_{120}$	$20.25 \pm 0.348^{* \#}$	$216.3 \pm 11.57^{* \#}$	$2.573 \pm 0.048$

**Tabla 1. Medias de talla, peso y CI de *Sparus aurata* (media  $\pm$  SEM; n=15) en los diferentes tiempos. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre  $T_0$  y otros tiempos de muestreo por tejido y la almohadilla (#) diferencias significativas entre  $T_{60}$  y otros tiempos según el test post hoc *Tukey*.**

## 4.2. Ingesta de microplásticos

Con respecto a la ingesta de MPs en el tiempo de estudio, los ejemplares de *S. aurata* ingirieron en total un ítem de plástico en tiempo inicial, en T<sub>60</sub> 136 ítems de plástico y en T<sub>120</sub> un total de 8 ítems de plástico. En T<sub>0</sub>, el 6,70% de los individuos ingirieron plásticos, en T<sub>60</sub> fue un total del 46,70% de ellos y en T<sub>120</sub> el 20% de ellos ha ingerido plásticos. En la Figura 2 se muestra la media de ítems por ejemplar es significativamente diferente entre los tiempos, T<sub>0</sub> ( $0.07 \pm 0.26$  ítems) y T<sub>60</sub> ( $9.07 \pm 20.2$  ítems); y entre T<sub>60</sub> y T<sub>120</sub> ( $0.07 \pm 0.26$  ítems).



**Figura 2.** Plásticos detectados en el tracto digestivo de *Sparus aurata* (media  $\pm$  SEM; n=15) en los diferentes tiempos. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre T<sub>0</sub> y otros tiempos de muestreo por tejido y la almohadilla (#) diferencias significativas entre T<sub>60</sub> y otros tiempos según el test post hoc Tukey.

## 4.3. Determinación de plastificantes

En la Tabla 2 se observan la cantidad de plastificantes DEP y DBP presentes en el hígado *S. aurata* en el estudio. Se encontraron diferencias significativas en la cantidad de DEP ente T<sub>0</sub> ( $0.21 \pm 0.02$   $\mu\text{g/g}$  tejido) y T<sub>60</sub> ( $0.46 \pm 0.05$   $\mu\text{g/g}$  tejido), así como entre T<sub>60</sub> y T<sub>120</sub> ( $0.20 \pm 0.03$   $\mu\text{g/g}$  tejido); no hubo diferencias significativas entre el tiempo inicial y T<sub>120</sub>.

Por otro lado, la cantidad de DBP en el hígado de los especímenes fue significativamente diferente entre todos los niveles, T<sub>0</sub> ( $0.58 \pm 0.05$   $\mu\text{g/g}$  tejido), T<sub>60</sub> ( $1.23 \pm 0.07$   $\mu\text{g/g}$  tejido) y T<sub>120</sub> ( $0.73 \pm 0.06$   $\mu\text{g/g}$  tejido).

	DEP ( $\mu\text{g/g}$ tejido)	DBP ( $\mu\text{g/g}$ tejido)
T <sub>0</sub>	$0.21 \pm 0.02$	$0.58 \pm 0.05$
T <sub>60</sub>	$0.46 \pm 0.05^*$	$1.23 \pm 0.07^*$
T <sub>120</sub>	$0.20 \pm 0.03^\#$	$0.73 \pm 0.06^*\#$

**Tabla 2.** Plastificantes detectados en el hígado de *Sparus aurata* (media  $\pm$  SEM; n=15) en los diferentes tiempos. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre T<sub>0</sub> y otros tiempos de muestreo por tejido y la almohadilla (#) diferencias significativas entre T<sub>60</sub> y otros tiempos según el test post hoc Tukey.



## 4.4. Actividad enzimática

### 4.4.1. Glutación S-transferasa

En los valores de la enzima GST (Figura 3) se observó un efecto significativo del Tiempo (ANOVA,  $F_{2,45}=20,52$ ,  $p<0,001$ ). Según la comparación entre los niveles del factor Tiempo (test post hoc *Tukey*), los valores obtenidos en T<sub>120</sub> ( $31.15 \pm 2.815$  nKat/mg prot) fueron significativamente superiores a los valores iniciales correspondientes a T<sub>0</sub> ( $12.84 \pm 1.837$  nKat/mg prot) y también fue significativo el valor de T<sub>60</sub> ( $35.28 \pm 3.091$  nKat/mg prot) comparado con T<sub>0</sub>. No se encontraron diferencias significativas entre T<sub>60</sub> y T<sub>120</sub>.

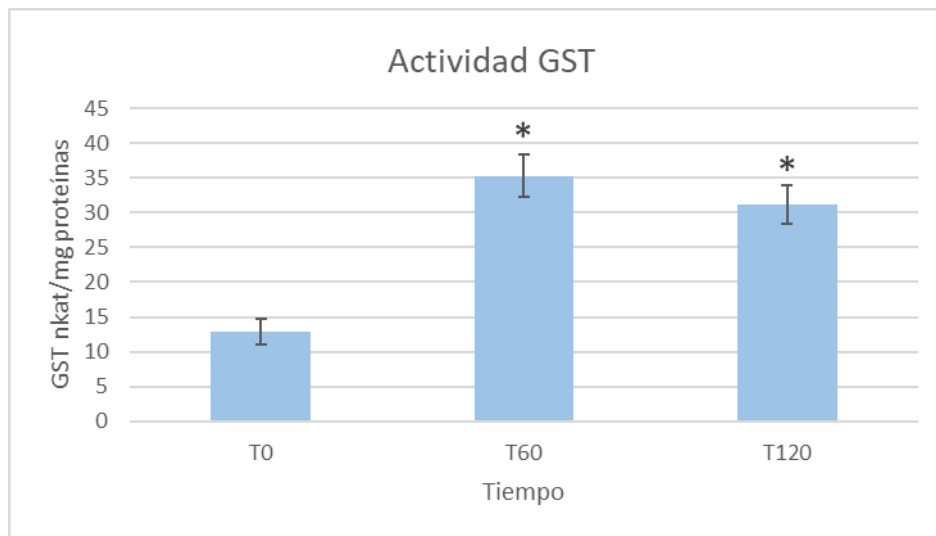


Figura 3. Actividades de la enzima antioxidante GST en el hígado de *Sparus aurata* (media  $\pm$  SEM; n=15) en los diferentes tiempos. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre T<sub>0</sub> y otros tiempos de muestreo según el test post hoc *Tukey*.

### 4.4.2. Catalasa

En la Tabla 3 se representan los efectos de los tiempos de muestreo sobre los niveles de CAT. Para esta enzima se encontraron diferencias significativas entre los niveles de tiempo en el hígado (ANOVA,  $F_{2,45}=5.39$ ;  $p<0.01$ ). Sin embargo, en plasma y sangre no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos. Los resultados obtenidos en el test post hoc (*Tukey*) realizado en las muestras de hígado mostraron diferencias significativas entre T<sub>0</sub> ( $613.70 \pm 88.667$  mK/mg prot) y T<sub>60</sub> ( $1015.2 \pm 67.916$  mK/mg prot), y entre T<sub>0</sub> y T<sub>120</sub> ( $908.14 \pm 102.84$  mK/mg prot). No se encontraron diferencias entre T<sub>60</sub> y T<sub>120</sub> en hígado, ni entre los diferentes tiempos de muestreo en sangre y plasma.

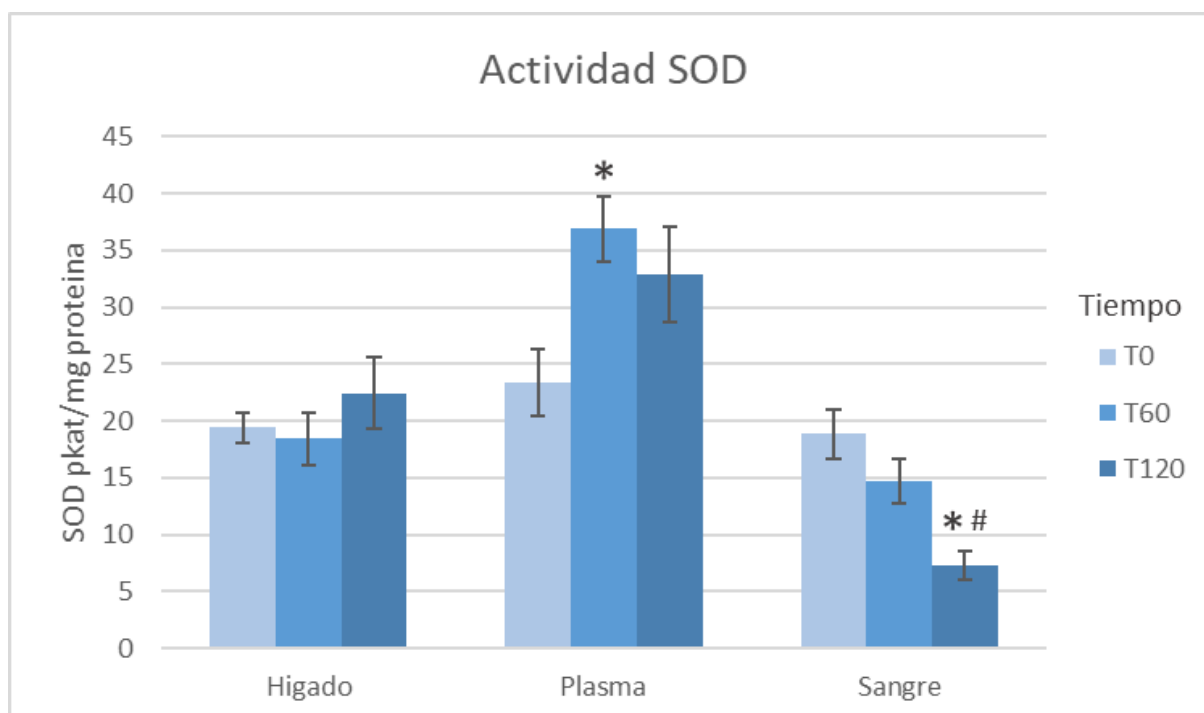
	Hígado (mK/mg prot)	Plasma (mK/mg prot)	Sangre (mK/mg prot)
T <sub>0</sub>	613.70 ± 88.667	237.41 ± 34.021	30.837 ± 3.0179
T <sub>60</sub>	1015.2 ± 67.916*	364.03 ± 72.419	36.739 ± 5.8913
T <sub>120</sub>	908.14 ± 102.84*	283.88 ± 56.048	31.117 ± 2.5031

**Tabla 3.** Actividades de la enzima catalasa en hígado, plasma y sangre de *Sparus aurata* (media ± SEM; n=15) en los diferentes tiempos. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre T<sub>0</sub> y otros tiempos de muestreo por tejido según el test post hoc *Tukey*.

#### 4.4.3. Superóxido dismutasa

La actividad enzimática del SOD se encuentra representada en la Figura 4. Se ha encontrado un efecto significativo del tiempo en plasma (ANOVA,  $F_{2,45}=3.66$ ,  $p<0.05$ ) y en sangre (ANOVA,  $F_{2,45}=9.93$ ,  $p<0.001$ ), pero no en hígado.

Según los resultados de las comparaciones múltiples del test post hoc (*Tukey*), en plasma los valores de T<sub>120</sub> ( $32.87 \pm 4.234$  pkat/mg de prot) fueron significativamente mayores a los del tiempo inicial ( $23.36 \pm 2.949$  pkat/mg de prot), mientras que no se encontraron diferencias entre T<sub>60</sub> y los otros tiempos. También se encontraron diferencias en sangre entre T<sub>0</sub> ( $18.83 \pm 2.193$  pkat/mg de prot) y T<sub>60</sub> ( $14.73 \pm 1.933$  pkat/mg de prot), y entre T<sub>0</sub> y T<sub>120</sub> ( $7.303 \pm 1.262$  pkat/mg de prot), pero no entre T<sub>60</sub> y T<sub>120</sub>.

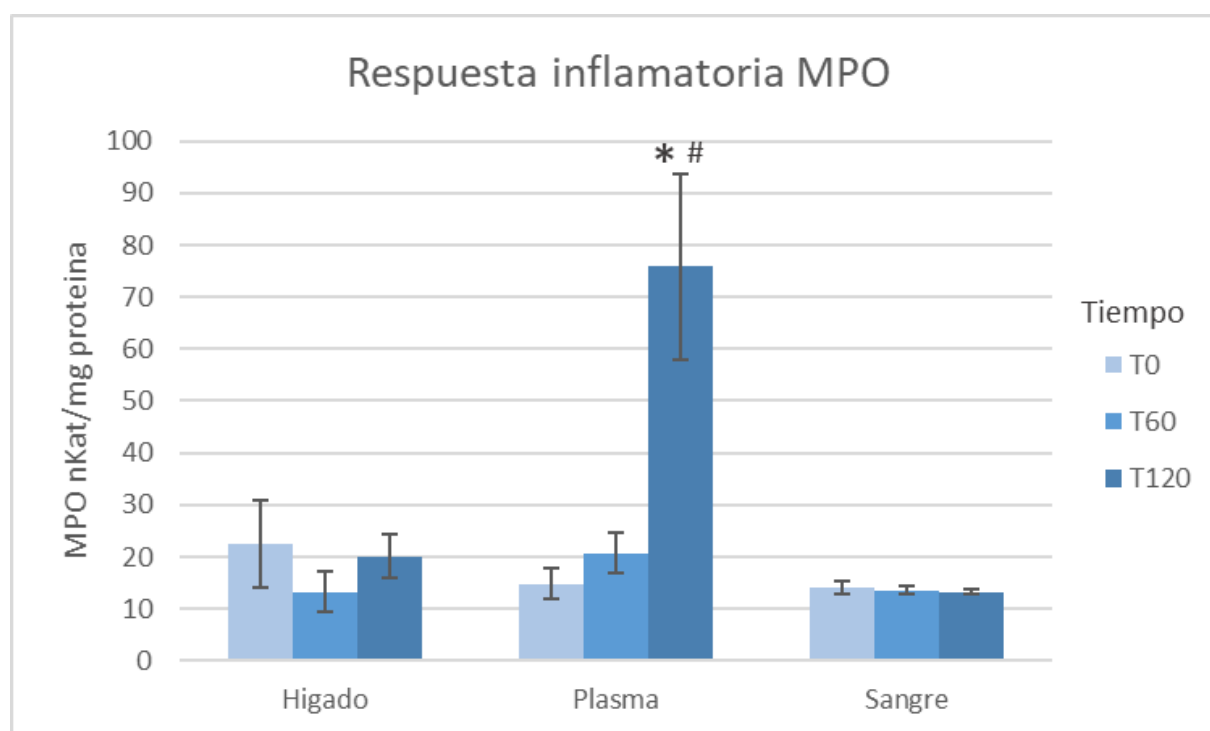


**Figura 4.** Actividades de la enzima SOD en hígado, plasma y sangre de *Sparus aurata* (media ± SEM; n=15) en los diferentes tiempos. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre T<sub>0</sub> y otros tiempos de muestreo por tejido y la almohadilla (#) diferencias significativas entre T<sub>60</sub> y otros tiempos según el test post hoc *Tukey*.

#### 4.4.4. Mieloperoxidasa

La actividad enzimática MPO se representa en la Figura 5. El resultado de la ANOVA de los tejidos por tiempo solo encontró diferencias entre los diferentes niveles del factor tiempo en plasma (ANOVA,  $F_{2,45}=8,55$ ,  $p<0.001$ ).

En cuanto a las comparaciones entre pares del factor tiempo se observó una mayor actividad en  $T_{120}$  ( $75.92 \pm 17.87$  nkat/mg prot) la cual es significativamente mayor a la determinada en  $T_0$  ( $14,78 \pm 2.96$  nkat/mg prot) en plasma, al igual que fue significativo el incremento de valores entre  $T_{60}$  ( $20.73 \pm 3.81$  nkat/mg prot) y  $T_{120}$ . Por último, no se apreciaron diferencias significativas entre  $T_0$  y  $T_{60}$  en plasma, ni entre los tiempos en hígado y sangre.



**Figura 5.** Actividades de la enzima MPO en hígado, plasma y sangre de *Sparus aurata* (media  $\pm$  SEM;  $n=15$ ) en los diferentes tiempos. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre  $T_0$  y otros tiempos de muestreo por tejido y la almohadilla (#) diferencias significativas entre  $T_{60}$  y otros tiempos según el test post hoc Tukey.

#### 4.5. Especies reactivas del oxígeno

En la Tabla 4 se representan las ROS detectadas en los tiempos de muestreo. Se encontraron diferencias significativas entre los niveles de tiempo tanto en hígado (ANOVA,  $F_{2,45}=4.95$ ;  $p<0.05$ ) como en sangre (ANOVA,  $F_{2,45}=3.33$ ;  $p<0.05$ ). Los resultados obtenidos en el test post hoc (Tukey) realizado en las muestras de hígado mostraron diferencias significativas entre  $T_0$  ( $1082.8 \pm 136.24$  RLU mg/prot) y  $T_{120}$  ( $1280.3 \pm 172.31$  RLU mg/prot), y entre  $T_{60}$  ( $1884.9 \pm 232.38$  RLU mg/prot) y  $T_{120}$ ; no se encontraron diferencias entre  $T_0$  y  $T_{60}$ . En sangre se encontraron diferencias entre  $T_{60}$  ( $15.55 \pm 3.62$  RLU mg/prot) y  $T_{120}$  ( $7.95 \pm 1.09$  RLU mg/prot), pero no entre  $T_0$  y el resto de los tiempos.

	Hígado (RLU mg/prot)	Sangre (RLU mg/prot)
T <sub>0</sub>	1082.8 ± 136.24	8.7754 ± 0.9448
T <sub>60</sub>	1884.9 ± 232.38*	15.552 ± 3.6242
T <sub>120</sub>	1280.3 ± 172.31#	7.9543 ± 1.0928#

Tabla 4. ROS detectada en hígado y sangre de *Sparus aurata* (media ± SEM; n=15) en los diferentes tiempos. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre T<sub>0</sub> y otros tiempos de muestreo por tejido y la almohadilla (#) diferencias significativas entre T<sub>60</sub> y otros tiempos según el test post hoc *Tukey*.

#### 4.6. Malondialdehído

Los valores de MDA están representados en la Tabla 5. Se observa un efecto significativo del tiempo sobre el daño celular en hígado (ANOVA,  $F_{2,45}=5.92$ ,  $p<0.01$ ) y plasma (ANOVA,  $F_{2,45}=3.35$ ,  $p<0.05$ ), pero no hay efectos sobre la sangre. Según los resultados de las comparaciones múltiples del test post hoc (*Tukey*) para el factor tiempo, el daño en T<sub>120</sub> (718.3 ± 60.05 nM/mg prot) en hígado fue significativamente mayor que en el tiempo inicial (395.3 ± 65.75 nM/mg prot). De igual manera también se encontraron diferencias significativas entre T<sub>0</sub> (2.99 ± 0.35 nM/mg prot) y T<sub>120</sub> (1.79 ± 0.20 nM/mg prot) en plasma. No hubo disparidad entre T<sub>60</sub> con el resto de los tiempos en hígado y plasma, ni entre los tiempos en sangre.

	Hígado (nM/mg prot)	Plasma (nM/mg prot)	Sangre (nM/mg prot)
T <sub>0</sub>	395.3 ± 65.75	2.995 ± 0.351	463.7 ± 26.95
T <sub>60</sub>	563.4 ± 69.44	2.363 ± 0.372	536.7 ± 36.80
T <sub>120</sub>	718.3 ± 60.05*	1.792 ± 0.205*	541.5 ± 20.51

Tabla 5. Actividades del MDA en hígado, plasma y sangre de *Sparus aurata* (media ± SEM; n=15) en los diferentes tiempos. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre T<sub>0</sub> y otros tiempos de muestreo por tejido según el test post hoc *Tukey*.

## 5. Discusión

Los MPs son materiales ubicuos en ambientes marinos, encontrándose tanto en superficie, como en la columna y en los sedimentos. Debido a su pequeño tamaño estos pueden ser ingeridos por la biota marina, pudiendo provocar un potencial efecto tóxico, tanto por el material en sí como por los contaminantes o xenobióticos que puedan absorber.

El incremento de la demanda de ciertos recursos marinos ha provocado el desarrollo e investigación de técnicas para la acuicultura para satisfacer esta necesidad, pero desgraciadamente ha aumentado en consecuencia los residuos plásticos provocados por esta industria. Por tanto, debido tanto a este fenómeno como a la propia contaminación antropogénica por MPs, es vital evaluar los efectos de estas partículas en las especies implicadas en la acuicultura.

Las doradas son peces de gran valor comercial debido a su consumo. Debido a ello es de suma importancia evaluar los posibles efectos de la ingesta de MPs en condiciones similares a como se mantienen en la industria acuícola. Los resultados de este estudio nos permitirán evaluar si los individuos comercializados pueden haberse visto afectados por la ingesta de MPs; así como evaluar la viabilidad de la utilización de métodos menos invasivos para evaluar dichos daños.

En el presente estudio se evaluaron los posibles efectos negativos provocados por la ingesta de MPs presentes en el medio natural en doradas durante 120 días. Se realizaron un total de 3 muestreos, uno inicial y otros dos cada 60 días, en los que se comprobaron los efectos tóxicos en hígado, plasma y sangre mediante análisis bioquímicos. El hígado se ha empleado en diferentes estudios para evaluar diferentes alteraciones metabólicas producidas por MPs debido a que es el principal responsable de la detoxificación y eliminación de moléculas tóxicas (Alomar *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2018). Por otro lado, los parámetros sanguíneos en peces se pueden ver alterados por la exposición a xenobióticos, lo que los convierte en posibles biomarcadores para evaluar los efectos de diferentes toxinas (Burgos-Aceves *et al.*, 2019; Forouhar Vajargahet, *et al.*, 2019; Ibrahim *et al.*, 2021).

Para la correcta evaluación de los resultados del presente estudio cabe mencionar que en algunos ejemplares del segundo muestreo ( $T_{60}$ ) se encontraron MPs en el tracto digestivo procedentes de las redes de las jaulas donde se disponían, llegándose a encontrar hasta un máximo de 77 macrofilamentos de plástico en uno de los individuos (Figura 6).



**Figura 6.** A la izquierda las redes utilizadas en las jaulas de acuicultura para este estudio. A la derecha los macrofilamentos de plásticos ingeridos por *Sparus aurata* en  $T_{60}$ .

En primer lugar, se evaluaron varios parámetros biológicos, entre ellos el peso y la talla medios. Estos parámetros mostraron que los especímenes muestreados fueron creciendo a lo largo del estudio. También se evaluó el Índice de Condición (CI), un parámetro que está vinculado a la disponibilidad de recursos alimenticios de la dorada. En este estudio, a pesar de que se mantienen dentro de unos parámetros estables y, por tanto, no hay diferencias significativas en el tiempo, muestran una tendencia a la disminución de este parámetro con el tiempo pudiéndose relacionar con altos niveles de estrés. El menor CI entre las muestras pertenece a al muestreo T<sub>60</sub>, que coincide con el periodo en que algunos de los especímenes mordisquearon las cuerdas de las jaulas. De acuerdo con el estudio de Jovanović *et al.* (2018) los individuos de *S. aurata* ante una ingesta realista de MPs no deben verse afectados estos parámetros biológicos ya que estas partículas son excretadas fácilmente por individuos adultos, por lo que resultados del presente estudio son los esperados; aun así, podrían provocar otros efectos físicos que provocaría esta bajada del CI como reducción de la saciedad (Kühn *et al.*, 2015).

En cuanto el análisis de la ingesta de MPs, tal y como se ha mencionado anteriormente, se encontraron en elevadas concentraciones en el tracto digestivo en T<sub>60</sub>, no así en el tiempo inicial y final. A su vez, se han encontraron concentraciones superiores de plastificantes en la T<sub>60</sub>, tanto de DEP como de DBP, que en el tiempo inicial y en T<sub>120</sub>.

La bioacumulación de aditivos plásticos en hígado en el muestreo T<sub>60</sub> podría ser provocada directamente por la ingesta de MPs. Debido a su apetito voraz y gran actividad, estos peces quedan expuestos a cualquier tipo de contaminante en el agua de mar. La estrecha relación entre el cultivo de estos organismos y el uso de aparejos fabricados con plástico contribuye a que presenten una mayor cantidad de fibras en el tracto digestivo. Algunos estudios demuestran la predisposición de algunos animales procedentes de granjas de acuicultura a contener una mayor cantidad de microfibras en el tracto digestivo que los que se encuentran en su estado salvaje (Mathalon & Hill, 2014, Reinold *et al.*, 2021).

En diferentes estudios se ha reflejado que la ingesta de MPs produce estrés oxidativo, inflamación y acumulación de lípidos (Lu *et al.*, 2016). Este estudio corrobora que *S. aurata* presenta diferentes mecanismos como defensa a estos efectos a lo largo de un periodo de tiempo prolongado en condiciones naturales. La exposición de contaminantes, como los MPs, induce una mayor respuesta fisiológica cuantificable en *S. aurata*. Actualmente, ya hay aportaciones de otros estudios realizados donde la dorada muestra un mayor grado de estrés oxidativo debido a la exposición de MPs en entornos controlados (Solomando *et al.*, 2020). En los periodos en que aumentó la ingesta de microplásticos, se ha observado un incremento de los valores de la actividad enzimática. Según las medidas totales obtenidas para cada para cada Tiempo, se obtienen generalmente los valores más altos de actividad enzimática en aquellos individuos muestreados en el T<sub>60</sub>.

Las enzimas CAT y SOD son las principales encargadas de la defensa y descomposición de algunas de las ROS (Lushchak, 2011) y, por tanto, de evitar un estrés oxidativo en el organismo. En un estudio reciente, se comprobó que las actividades de CAT y SOD aumentaron en el hígado después de 30 días de exposición a MP en *Symphysodon aequifasciatus* (Wen, *et al.*, 2018). En *Danio rerio* se mostraron de igual manera aumento en estas enzimas después de 7 días

de exposición a MPs de poliestireno (Lu *et al.*, 2016) y un aumento en la enzima SOD en *Oreochromis niloticus* (Ding *et al.*, 2018).

Los valores obtenidos de la actividad enzimática en CAT muestran diferencias significativas en hígado entre el tiempo inicial y T<sub>60</sub>, así como entre el tiempo inicial y T<sub>120</sub>, donde los valores más altos se han obtenido en T<sub>60</sub> cuando el número de contaminantes encontrados en el tracto digestivo era mayor. Si bien en plasma y sangre la diferencia entre los valores a lo largo del tiempo de estudio no fue significativa, podemos observar que los valores para el T<sub>60</sub> también fueron los más elevados en ambos tejidos.

Por otro lado, la actividad de la enzima SOD también muestra diferencias entre el tiempo inicial y el T<sub>60</sub> en plasma, así como entre T<sub>0</sub> y T<sub>120</sub>, con los mayores valores en T<sub>60</sub>. En cambio, en sangre los valores fueron significativamente diferentes mostrando un descenso de la actividad de esta enzima a lo largo del estudio.

En otros estudios publicados, además de las enzimas antioxidantes, también se analizó la actividad de la glutatión s-transferasa ya que suelen actuar conjuntamente para la protección frente al estrés oxidativo. La GST participa en el proceso de biotransformación de fase II de xenobióticos, produciendo un conjugado de glutatión más hidrófilo de la sustancia exógena, ayudando a su eliminación (Sureda *et al.*, 2006).

En este estudio se puede observar un incremento en el sistema de detoxificación con el aumento de la actividad de la GST. Destaca un aumento significativo entre el tiempo inicial y T<sub>60</sub>, siendo nuevamente el tiempo que muestra una mayor actividad enzimática; así como entre el tiempo inicial y T<sub>120</sub>, aunque en menor medida. Este resultado concuerda con los de otros estudios en condiciones similares, en que se encontró un ligero aumento de esta enzima en el hígado de algunos peces que habían ingerido MPs (Alomar *et al.*, 2017; Barboza *et al.*, 2018; Solomando *et al.*, 2021). Por tanto, por nuestro resultado y la demostración de estudios previos, podemos sugerir que la ingesta de MP induce una importante actividad de desintoxicación en el hígado (Sureda *et al.*, 2006).

Otro efecto negativo ligado a la ingesta de MPs es la alteración del sistema inmunológico (Espinosa *et al.*, 2018). Como indicador del estado de inmunidad es comúnmente utilizada la MPO, una enzima ferrosa lisosomal que interviene en la erradicación de materias extrañas extracelulares (Chen *et al.*, 2019), esta produce ácido hipocloroso, un oxidante fuerte que es capaz de eliminar bacterias y oxidar componentes exógenos que contribuyen al estrés oxidativo y al daño tisular (Mahmoudi *et al.*, 2011). Por tanto, cuando esta enzima es detectada en altos niveles en un tejido, suele corresponder a una infiltración de células inmunes y por ende a una respuesta inflamatoria (Jeong *et al.*, 2017; Qiao *et al.*, 2019).

En nuestro estudio tan solo encontramos diferencias significativas en plasma a lo largo del tiempo, caracterizándose por unos niveles realmente altos de MPO en T<sub>120</sub>. En hígado, los datos no fueron significativamente diferentes por lo que podemos intuir que no se produjo una infiltración suficiente en este órgano para desencadenar la respuesta inflamatoria. Este resultado no fue el esperado, ya que muestra discrepancias con los obtenidos en plasma, por lo que no podemos afirmar que la inducción a esta respuesta inflamatoria se produzca por la presencia de

MPs. En otros estudios se ha informado de cambios histológicos e inflamatorios en el hígado tanto en peces de agua dulce (Jabeen *et al.*, 2018) así como en peces de origen marino como *Dicentrarchus labrax* (Espinosa *et al.*, 2019), e incluso en la especie utilizada en el presente estudio, *S. aurata* (Solomando *et al.* 2021). Si bien es necesaria una mayor cantidad de ensayos, la detección de alteración tisular y estrés oxidativo por exposición de MPs mediante el análisis plasmático es prometedora.

Los niveles de ROS medidos en sangre e hígado corroboraron los datos obtenidos por las enzimas analizadas. Se puede observar que tanto en hígado como en sangre se detecta una producción significativamente mayor de ROS en T<sub>60</sub> que corresponderían al estrés oxidativo provocado por los plásticos encontrados en los especímenes muestreados en este tiempo. En este tiempo coincide con el incremento de la respuesta de las enzimas CAT, SOD y GST (Sayed & Soliman, 2018; Soliman *et al.*, 2019), por lo que podemos interpretar que el incremento de la capacidad antioxidante no es suficiente para bloquear o reducir la producción de ROS.

Finalmente evaluamos el MDA, un subproducto de la peroxidación lipídica, proceso considerado como uno de los primeros eventos de daño celular en organismos asociado a una desestructuración y pérdida de la membrana celular. En nuestro estudio se han encontrado diferencias significativas entre el tiempo inicial y T<sub>120</sub> tanto en hígado como en plasma, no así en sangre. El contenido de MDA aumentó a lo largo de todo el estudio sugiriendo que la respuesta del sistema enzimático fue insuficiente a la hora de prevenir el daño oxidativo de lípidos en el hígado. Nuestros resultados concuerdan con otros estudios (Ferreira *et al.*, 2016; Solomando *et al.*, 2020; Solomando *et al.*, 2021) los cuales obtuvieron niveles más altos de MDA en peces expuestos a dietas que contienen MPs. En plasma, los niveles de MDA bajaron significativamente de forma progresiva, suceso que podría deberse a que el MDA puede reaccionar con las proteínas generando grupos carbonilo (Capó *et al.*, 2014, Capó *et al.*, 2021). Debido a la escasa bibliografía con relación a la evaluación del efecto de los MPs mediante análisis hematológicos, hace falta un mayor número de estudios relacionados para evaluar estos resultados.

En resumen, en este estudio hemos podido demostrar que la ingesta de plásticos en el organismo desencadena una serie de reacciones metabólicas relacionadas con el estrés oxidativo por presencia de ROS en peces; en este caso, *S. aurata*. Hígado y plasma han demostrado ser los tejidos más sensibles ante la presencia de contaminantes, mientras que la sangre ha demostrado ser un bioindicador ineficaz debido a que las respuestas proporcionadas fueron nulas o incongruentes en su mayoría. Bajo estos resultados podríamos interpretar que las partículas de MP ingeridas podrían llegar al torrente sanguíneo atravesando las células de los enterocitos, llegando al hígado, provocando la respuesta de estas enzimas (Solomando *et al.*, 2021). A falta de un mayor número de estudios relacionados, el plasma podría ser un buen bioindicador de estrés oxidativo por ingesta de MPs que posibilitaría determinar el estado del animal de manera rápida y efectiva sin necesidad de su sacrificio.

El hecho de que algunos animales mordisquearan las redes de las jaulas hace que nos planteemos los problemas que pueden ocasionar los aparejos e instalación hechos de plástico utilizados en la industria acuícola, tanto a la biota salvaje como a los propios animales de las granjas. El aumento de la demanda de productos marinos por parte de una población creciente



probablemente provoque que la eventualidad acontecida en este estudio se convierta en un incidente recurrente en acuicultura y pesca. Por tanto, es necesario un mayor número de estudios sobre como los MPs afectan tanto fisiológicamente como metabólicamente a diferentes organismos marinos, así como el desarrollo de nuevos materiales inocuos que puedan sustituir a los plásticos.

## 6. Conclusiones

Nuestro estudio proporciona datos interesantes sobre el impacto de la ingesta de microplásticos en *S. aurata*. Las enzimas relacionadas con el estrés oxidativo y la detoxificación utilizadas como biomarcadores mostraron resultados similares en plasma e hígado debido a la ingesta de MPs de los individuos en uno de los muestreos, mientras que no se observó evidencia en eritrocitos. Este hecho nos plantea como pueden afectar a diferentes organismos estos materiales utilizados en la industria acuícola y pesquera, por lo que serían necesarios nuevos estudios relacionados. Por otro lado, el presente estudio proporciona resultados esperanzadores sobre la posibilidad de detectar el impacto provocado por la ingesta de microplásticos mediante el análisis de plasma.

## 7. Bibliografía

- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 121–126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- Alomar, C., Sureda, A., Capó, X., Guijarro, B., Tejada, S., & Deudero, S. (2017). Microplastic ingestion by *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758 fish and its potential for causing oxidative stress. *Environmental Research*, 159, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.07.043>
- Ashton, K., Holmes, L., & Turner, A. (2010). Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 60(11), 2050–2055. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.014>
- Aoki, K. A., Harris, C. A., Katsiadaki, I., & Sumpter, J. P. (2011). Evidence suggesting that di-n-butyl phthalate has antiandrogenic effects in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(6), 1338–1345. <https://doi.org/10.1002/etc.502>
- Auta, H., Emenike, C., & Fauziah, S. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment International*, 102, 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.02.013>
- Avio, C. G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., & Regoli, F. (2015). Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution*, 198, 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.021>
- Barboza, L. G. A., Vieira, L. R., Branco, V., Carvalho, C., & Guilhermino, L. (2018). Microplastics increase mercury bioconcentration in gills and bioaccumulation in the liver, and cause oxidative stress and damage in *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34125-z>
- Barboza, L. G. A., Vieira, L. R., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, F., Carvalho, C., & Guilhermino, L. (2018). Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquatic Toxicology*, 195, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.008>
- Botterell, Z. L., Beaumont, N., Dorrington, T., Steinke, M., Thompson, R. C., & Lindeque, P. K. (2019). Bioavailability and effects of microplastics on marine zooplankton: A review. *Environmental Pollution*, 245, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.065>
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., & Thompson, R. C. (2008). Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science & Technology*, 42(13), 5026–5031. <https://doi.org/10.1021/es800249a>
- Burgos-Aceves, M. A., Lionetti, L., & Faggio, C. (2019). Multidisciplinary haematology as prognostic device in environmental and xenobiotic stress-induced response in fish. *Science of The Total Environment*, 670, 1170–1183. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.275>
- Capeillère-Blandin, C. (1998). Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a two-electron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. *Biochemical Journal*, 336(2), 395–404. <https://doi.org/10.1042/bj3360395>

Capó, X., Martorell, M., Sureda, A., Llompарт, I., Tur, J. A., & Pons, A. (2014). Diet supplementation with DHA-enriched food in football players during training season enhances the mitochondrial antioxidant capabilities in blood mononuclear cells. *European Journal of Nutrition*, 54(1), 35–49. <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0683-2>

Capó, X., Rubio, M., Solomando, A., Alomar, C., Compa, M., Sureda, A., & Deudero, S. (2021). Microplastic intake and enzymatic responses in *Mytilus galloprovincialis* reared at the vicinities of an aquaculture station. *Chemosphere*, 280, 130575. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130575>

Chen, C., Yang, B., Abbas Raza, S. H., Zhang, D., Wu, T., Zhang, Z., Ullah, I., Khan, R., Yang, G., Wang, C., Wang, G., Shan, X., Kang, Y., & Qian, A. (2019). Role of Myeloperoxidase of northern snakehead (*Channa argus*) in *Aeromonas veronii* infection. *Microbial Pathogenesis*, 135, 103622. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103622>

Compa, M., Ventero, A., Iglesias, M., & Deudero, S. (2018). Ingestion of microplastics and natural fibres in *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) and *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) along the Spanish Mediterranean coast. *Marine Pollution Bulletin*, 128, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.01.009>

Dehaut, A., Cassone, A. L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Rivière, G., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G., & Paul-Pont, I. (2016). Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution*, 215, 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.018>

de Sá, L. C., Oliveira, M., Ribeiro, F., Rocha, T. L., & Futter, M. N. (2018). Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future? *Science of The Total Environment*, 645, 1029–1039. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.207>

Deudero, S., & Alomar, C. (2015). Mediterranean marine biodiversity under threat: Reviewing influence of marine litter on species. *Marine Pollution Bulletin*, 98(1–2), 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.07.012>

Digka, N., Tsangaris, C., Torre, M., Anastasopoulou, A., & Zeri, C. (2018). Microplastics in mussels and fish from the Northern Ionian Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 135, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.06.063>

Ding, J., Zhang, S., Razanajatovo, R. M., Zou, H., & Zhu, W. (2018). Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Pollution*, 238, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.001>

Domènech, F., Aznar, F., Raga, J., & Tomás, J. (2019). Two decades of monitoring in marine debris ingestion in loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*, from the western Mediterranean. *Environmental Pollution*, 244, 367–378. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.047>

EFSA. (2016). Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. (14(6)). *EFSA Journal*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4501>

Espinosa, C., Cuesta, A., & Esteban, M. N. (2017). Effects of dietary polyvinylchloride microparticles on general health, immune status and expression of several genes related to stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 68, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.006>

Espinosa, C., Esteban, M. N., & Cuesta, A. (2019). Dietary administration of PVC and PE microplastics produces histological damage, oxidative stress and immunoregulation in European

sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 95, 574–583. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.10.072>

Espinosa, C., García Beltrán, J. M., Esteban, M. A., & Cuesta, A. (2018). In vitro effects of virgin microplastics on fish head-kidney leucocyte activities. *Environmental Pollution*, 235, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.054>

Expósito, N., Rovira, J., Sierra, J., Folch, J., & Schuhmacher, M. (2021). Microplastics levels, size, morphology and composition in marine water, sediments and sand beaches. Case study of Tarragona coast (western Mediterranean). *Science of The Total Environment*, 786, 147453. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147453>

FAO. (2021). Programa de información de especies acuáticas. *Sparus aurata*. Programa de información de especies acuáticas. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus\\_aurata/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/es)

Fazio, F., Piccione, G., Saoca, C., Caputo, A., & Cecchini, S. (2017). Assessment of oxidative stress in Flathead mullet (*Mugil cephalus*) and Gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Veterinárni Medicína*, 60(No. 12), 691–695. <https://doi.org/10.17221/8583-vetmed>

Ferreira, G. V. B., Barletta, M., Lima, A. R. A., Dantas, D. V., Justino, A. K. S., & Costa, M. F. (2016). Plastic debris contamination in the life cycle of Acoupa weakfish (*Cynoscion acoupa*) in a tropical estuary. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 73(10), 2695–2707. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsw108>

Ferreira, P., Fonte, E., Soares, M. E., Carvalho, F., & Guilhermino, L. (2016). Effects of multi-stressors on juveniles of the marine fish *Pomatoschistus microps*: Gold nanoparticles, microplastics and temperature. *Aquatic Toxicology*, 170, 89–103. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.011>

Flohé, L., & ötting, F. (1984). [10] Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology*, 93–104. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05013-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05013-8)

Foekema, E. M., de Grijter, C., Mergia, M. T., van Franeker, J. A., Murk, A. J., & Koelmans, A. A. (2013). Plastic in North Sea Fish. *Environmental Science & Technology*, 47(15), 8818–8824. <https://doi.org/10.1021/es400931b>

Forouhar Vajargah, M., Imanpoor, M. R., Shabani, A., Hedayati, A., & Faggio, C. (2019). Effect of long-term exposure of silver nanoparticles on growth indices, hematological and biochemical parameters and gonad histology of male goldfish (*Carassius auratus gibelio*). *Microscopy Research and Technique*, 82(7), 1224–1230. <https://doi.org/10.1002/jemt.23271>

Fossi, M. C., Marsili, L., Bainsi, M., Giannetti, M., Coppola, D., Guerranti, C., Caliani, I., Minutoli, R., Lauriano, G., Finioia, M. G., Rubegni, F., Panigada, S., Bérubé, M., Urbán Ramírez, J., & Panti, C. (2016). Fin whales and microplastics: The Mediterranean Sea and the Sea of Cortez scenarios. *Environmental Pollution*, 209, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.022>

Fulton, T., 1902. The rate of growth of fishes. 20th Annual Report of the Fishery Board of Scotland 3: 326–446.

GESAMP. (2015). Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment. IMO/FAO/UNESCO-IOC/ÚNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2017002714>

Grigorakis, K. (2007). Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture*, 272(1–4), 55–75. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.062>

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-Transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130–7139. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)42083-8)

Ibrahim, A. T., Banaee, M., & Sureda, A. (2021). Genotoxicity, oxidative stress, and biochemical biomarkers of exposure to green synthesized cadmium nanoparticles in *Oreochromis niloticus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 242, 108942. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108942>

Jabeen, K., Li, B., Chen, Q., Su, L., Wu, C., Hollert, H., & Shi, H. (2018). Effects of virgin microplastics on goldfish (*Carassius auratus*). *Chemosphere*, 213, 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.031>

Jeong, C. B., Kang, H. M., Lee, M. C., Kim, D. H., Han, J., Hwang, D. S., Souissi, S., Lee, S. J., Shin, K. H., Park, H. G., & Lee, J. S. (2017). Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclops nana*. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep41323>

Jovanović, B. (2017). Ingestion of microplastics by fish and its potential consequences from a physical perspective. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13(3), 510–515. <https://doi.org/10.1002/ieam.1913>

Jovanović, B., Gökdag, K., Güven, O., Emre, Y., Whitley, E. M., & Kideys, A. E. (2018). Virgin microplastics are not causing imminent harm to fish after dietary exposure. *Marine Pollution Bulletin*, 130, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.03.016>

Karami, A., Romano, N., Galloway, T., & Hamzah, H. (2016). Virgin microplastics cause toxicity and modulate the impacts of phenanthrene on biomarker responses in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Environmental Research*, 151, 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.07.024>

Koelmans, A. A., Besseling, E., & Foekema, E. M. (2014). Leaching of plastic additives to marine organisms. *Environmental Pollution*, 187, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.12.013>

Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E., Gamsiz, K., & Tandler, A. (2001). Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture*, 194(1–2), 107–121. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(00\)00501-9](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(00)00501-9)

Krüger, L., Casado-Coy, N., Valle, C., Ramos, M., Sánchez-Jerez, P., Gago, J., Carretero, O., Beltran-Sanahuja, A., & Sanz-Lazaro, C. (2020). Plastic debris accumulation in the seabed derived from coastal fish farming. *Environmental Pollution*, 257, 113336. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113336>

Kühn, S., Bravo Rebolledo, E. L., & van Franeker, J. A. (2015). Deleterious Effects of Litter on Marine Life. *Marine Anthropogenic Litter*, 75–116. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_4)

Limonta, G., Mancina, A., Benkhalqui, A., Bertolucci, C., Abelli, L., Fossi, M. C., & Panti, C. (2019). Microplastics induce transcriptional changes, immune response and behavioral alterations in adult zebrafish. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52292-5>

Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., Ding, L., & Ren, H. (2016). Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver. *Environmental Science & Technology*, 50(7), 4054–4060. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00183>

- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Lusher, A., Hollman, P., & Mendoza-Hill, J. (2017). Microplastics in Fisheries and Aquaculture: Status of Knowledge on Their Occurrence and Implications for Aquatic Organisms and Food Safety. Food & Agriculture Organization of the UN (FAO).
- Lusher, A., McHugh, M., & Thompson, R. (2013). Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine Pollution Bulletin*, 67(1–2), 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.028>
- Mahmoudi, M., Azadmanesh, K., Shokrgozar, M. A., Journeay, W. S., & Laurent, S. (2011). Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle. *Chemical Reviews*, 111(5), 3407–3432. <https://doi.org/10.1021/cr1003166>
- Mathalon, A., & Hill, P. (2014). Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Marine Pollution Bulletin*, 81(1), 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.02.018>
- Oehlmann, J., Oetken, M., & Schulte-Oehlmann, U. (2008). A critical evaluation of the environmental risk assessment for plasticizers in the freshwater environment in Europe, with special emphasis on bisphenol A and endocrine disruption. *Environmental Research*, 108(2), 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.07.016>
- Pedà, C., Caccamo, L., Fossi, M. C., Gai, F., Andaloro, F., Genovese, L., Perdichizzi, A., Romeo, T., & Maricchiolo, G. (2016). Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: Preliminary results. *Environmental Pollution*, 212, 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.083>
- Peng, J., Wang, J., & Cai, L. (2017). Current understanding of microplastics in the environment: Occurrence, fate, risks, and what we should do. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13(3), 476–482. <https://doi.org/10.1002/ieam.1912>
- Pham, C. K., Ramirez-Llodra, E., Alt, C. H. S., Amaro, T., Bergmann, M., Canals, M., Company, J. B., Davies, J., Duineveld, G., Galgani, F., Howell, K. L., Huvenne, V. A. I., Isidro, E., Jones, D. O. B., Lastras, G., Morato, T., Gomes-Pereira, J. N., Purser, A., Stewart, H., ... Tyler, P. A. (2014). Marine Litter Distribution and Density in European Seas, from the Shelves to Deep Basins. *PLoS ONE*, 9(4), e95839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095839>
- Pinya, S., Tejada, S., Capó, X., & Sureda, A. (2016). Invasive predator snake induces oxidative stress responses in insular amphibian species. *Science of The Total Environment*, 566–567, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.035>
- Plastics Europe. (2021). *Plastics —the Facts 2020*. An analysis of European plastics production, demand and waste data. <https://www.plasticseurope.org>.
- Qiao, R., Sheng, C., Lu, Y., Zhang, Y., Ren, H., & Lemos, B. (2019). Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish. *Science of The Total Environment*, 662, 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.245>
- Reinold, S., Herrera, A., Saliu, F., Hernández-González, C., Martínez, I., Lasagni, M., & Gómez, M. (2021). Evidence of microplastic ingestion by cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Marine Pollution Bulletin*, 168, 112450. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112450>

Rocha-Santos, T., & Duarte, A. C. (2015). A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 65, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.011>

Rochman, C. M., Hoh, E., Hentschel, B. T., & Kaye, S. (2013). Long-Term Field Measurement of Sorption of Organic Contaminants to Five Types of Plastic Pellets: Implications for Plastic Marine Debris. *Environmental Science & Technology*, 130109073312009. <https://doi.org/10.1021/es303700s>

Rochman, C. M., Hoh, E., Kurobe, T., & Teh, S. J. (2013). Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Scientific Reports*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/srep03263>

Rochman, C. M., Kurobe, T., Flores, I., & Teh, S. J. (2014). Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. *Science of The Total Environment*, 493, 656–661. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.051>

Romeo, T., Pietro, B., Pedà, C., Consoli, P., Andaloro, F., & Fossi, M. C. (2015). First evidence of presence of plastic debris in stomach of large pelagic fish in the Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 95(1), 358–361. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.048>

Santillo, D., Miller, K., & Johnston, P. (2017). Microplastics as contaminants in commercially important seafood species. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13(3), 516–521. <https://doi.org/10.1002/ieam.1909>

Sayed, A. E. D. H., & Soliman, H. A. (2018). Modulatory effects of green tea extract against the hepatotoxic effects of 4-nonylphenol in catfish (*Clarias gariepinus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.007>

Simon-Sánchez, L., Grelaud, M., Garcia-Orellana, J., & Ziveri, P. (2019). River Deltas as hotspots of microplastic accumulation: The case study of the Ebro River (NW Mediterranean). *Science of The Total Environment*, 687, 1186–1196. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.168>

Soliman, H. A., Hamed, M., Lee, J. S., & Sayed, A. E. D. H. (2019). Protective effects of a novel pyrazolecarboxamide derivative against lead nitrate induced oxidative stress and DNA damage in *Clarias gariepinus*. *Environmental Pollution*, 247, 678–684. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.074>

Solomando, A., Capó, X., Alomar, C., Álvarez, E., Compa, M., Valencia, J. M., Pinya, S., Deudero, S., & Sureda, A. (2020). Long-term exposure to microplastics induces oxidative stress and a pro-inflammatory response in the gut of *Sparus aurata* Linnaeus, 1758. *Environmental Pollution*, 266, 115295. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115295>

Solomando, A., Capó, X., Alomar, C., Compa, M., Valencia, J. M., Sureda, A., & Deudero, S. (2021). Assessment of the effect of long-term exposure to microplastics and depuration period in *Sparus aurata* Linnaeus, 1758: Liver and blood biomarkers. *Science of The Total Environment*, 786, 147479. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147479>

Sureda, A., Box, A., Enseñat, M., Alou, E., Tauler, P., Deudero, S., & Pons, A. (2006). Enzymatic antioxidant response of a labrid fish (*Coris julis*) liver to environmental caulerpyne. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 144(2), 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.001>

Sureda, A., Capó, X., Busquets-Cortés, C., & Tejada, S. (2018). Acute exposure to sunscreen containing titanium induces an adaptive response and oxidative stress in *Mytilus*

*galloprovincialis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 58–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.014>

Sureda, A., Tauler, P., Aguiló, A., Cases, N., Fuentespina, E., Córdova, A., Tur, J. A., & Pons, A. (2005). Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. *Free Radical Research*, 39(12), 1317–1324.  
<https://doi.org/10.1080/10715760500177500>

Teles, M., Pacheco, M., & Santos, M. (2005). *Sparus aurata* L. liver EROD and GST activities, plasma cortisol, lactate, glucose and erythrocytic nuclear anomalies following short-term exposure either to 17 $\beta$ -estradiol (E2) or E2 combined with 4-nonylphenol. *Science of The Total Environment*, 336(1–3), 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.05.004>

Teuten, E. L., Saquing, J. M., Knappe, D. R. U., Barlaz, M. A., Jonsson, S., Björn, A., Rowland, S. J., Thompson, R. C., Galloway, T. S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P. H., Tana, T. S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M. P., Akkhavong, K., ...Takada, H. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2027–2045. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0284>

van Sebille, E., Wilcox, C., Lebreton, L., Maximenko, N., Hardesty, B. D., van Franeker, J. A., Eriksen, M., Siegel, D., Galgani, F., & Law, K. L. (2015). A global inventory of small floating plastic debris. *Environmental Research Letters*, 10(12), 124006.  
<https://doi.org/10.1088/1748-9326/10/12/124006>

von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., & Köhler, A. (2012). Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure. *Environmental Science & Technology*, 46(20), 11327–11335.  
<https://doi.org/10.1021/es302332w>

Wen, B., Jin, S. R., Chen, Z. Z., Gao, J. Z., Liu, Y. N., Liu, J. H., & Feng, X. S. (2018). Single and combined effects of microplastics and cadmium on the cadmium accumulation, antioxidant defence and innate immunity of the discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*). *Environmental Pollution*, 243, 462–471. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.029>

Wright, S. L., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental Pollution*, 178, 483–492.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.031>

Yokota, K., Waterfield, H., Hastings, C., Davidson, E., Kwietniewski, E., & Wells, B. (2017). Finding the missing piece of the aquatic plastic pollution puzzle: Interaction between primary producers and microplastics. *Limnology and Oceanography Letters*, 2(4), 91–104.  
<https://doi.org/10.1002/lol2.10040>

Zena, R., Speciale, A., Calabrò, C., Calò, M., Palombieri, D., Saija, A., Cimino, F., Trombetta, D., & Lo Cascio, P. (2015). Exposure of sea bream (*Sparus aurata*) to toxic concentrations of benzo[a]pyrene: possible human health effect. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.07.001>