

**Aina Anguera Sánchez**

**EFFECTES DELS NANOPLÀSTICS EN LA VIABILITAT CEL·LULAR I ESTRÈS  
OXIDATIU DE LES HUVEC I LES HCASMIC**

**TREBALL FI DE GRAU**

**Dirigit per la Dra. Montserrat Bellés i la Dra. M<sup>a</sup> Victòria Linares**

**Grau de Nutrició Humana i Dietètica**



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

**Reus**

**2024**

## RESUM

Els plàstics són materials omnipresents a la vida quotidiana moderna. La seva persistència al medi ambient i els possibles efectes adversos sobre la salut humana han generat una creixent preocupació a nivell mundial. Els nanoplàstics (NPs), una fracció més petita dels microplàstics (MPs), representen nous desafiaments en termes de detecció, toxicitat i impacte sobre al salut i el medi ambient. En particular, l'exposició oral als NPs és una via important, ja que aquests poden ser absorbits a l'intestí i arribar a la circulació sistèmica, afectant a diverses cèl·lules del sistema cardiovascular. En aquest treball s'han exposat les cèl·lules endotelials vasculares humanes (HUVEC) i les cèl·lules musculars vasculares humanes (HCASMC) a nanoplàstics de poliestirè (NPs-PS) de 100 nm a diverses concentracions i temps d'exposició, amb l'objectiu de determinar els efectes a nivell vascular, en termes de viabilitat i estrès oxidatiu (EO). Els resultats mostren una activació notable dels enzims superòxid dismutasa (SOD) i catalasa (CAT), tant a les HUVEC com a les HCASMC, amb una major activitat a les cèl·lules exposades a concentracions més altes (10 µg/ml) de NPs-PS. No obstant, aquesta resposta antioxidant per prevenir la citotoxicitat, no és suficient en el cas de les HCASMC, ja que s'evidencia un augment de la mortalitat a mesura que augmenta la concentració i el temps d'exposició. En contrast, les HUVEC no mostren indicis de mortalitat cel·lular després de l'exposició a NPs-PS. Aquestes troballes destaquen la importància de continuar investigant els efectes en la salut cardiovascular i el paper crucial de l'EO en la citotoxicitat induïda pels NPs.

## ABSTRACT

Plastics are ubiquitous materials in modern daily life. Their persistence in the environment and potential adverse effects on human health have generated growing global concern. Nanoplastics (NPs), a smaller fraction of microplastics (MPs), present new challenges in terms of detection, toxicity, and impact on health and the environment. Oral exposure to NPs is particularly important, as they can be absorbed in the intestine and reach systemic circulation, affecting various cells of the cardiovascular system. In this study, human vascular endothelial cells (HUVEC) and human vascular smooth muscle cells (HCASMC) were exposed to 100 nm polystyrene nanoplastics (NPs-PS) at various concentrations and exposure times, with the aim of determining vascular effects in terms of viability and oxidative stress (OS). The results show notable activation of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in both HUVEC and HCASMC, with higher activity in cells exposed to higher concentrations (10 µg/ml) of NPs-PS. However, this antioxidant response to prevent cytotoxicity is insufficient in the case of HCASMC, as evidenced by an increase in mortality with higher concentrations and longer exposure times. In contrast, HUVEC show no signs of cell mortality after exposure to NPs-PS. These findings underscore the importance of continued investigation into the cardiovascular health effects and the crucial role of OS in the cytotoxicity induced by NPs.

## PARAULES CLAU

HUVEC; HCASMC; SOD; CAT; Nanoplàstics; Viabilitat cel·lular; Estrès oxidatiu

## LLISTAT D'ABREVIATURES

PE	Polietilè
PES	Polièster saturat
PS	Poliestirè
PV	Polivinil
PP	Polipropilè
MPs	Microplàstics
NPs	Nanoplàstics
MNPs	Microplàstics i nanoplàstics
PET	Politeraftalat d'etilè
PVC	Policlorur de vinil
BPA	Bisfenol A
NF	Nonifenol
BFR	Retardants de flama bromats
COH	Contaminants orgànics hidrofòbics
HAP	Hidrocarburs aromàtics policíclics
BPC	Bifenil Policlorat
ROS	Espècies reactives d'oxigen
EO	Estrès oxidatiu
HTA	Hipertensió arterial
DM	Diabetis Mellitus
SOD	Superòxid dismutasa
CAT	Catalasa
GR	Glutació reductasa
GPX	Glutació peroxidasa
HUVEC	Cèl·lules endotelials vasculars humanes
HCASMC	Cèl·lules musculars vasculars humanes
MTT	Assaig de bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli

## **AGRAÏMENTS**

En primer lloc, vull expressar el meu agraïment a les meves tutores, les doctores Montserrat Bellés i M<sup>a</sup> Victòria Linares, per la seva guia, suport i implicació en tota la trajectòria de l'elaboració del treball de fi de grau. Des d'un primer moment van apostar per la idea que els hi vaig proposar, facilitant-me els recursos necessaris, tant econòmics, com d'instal·lacions i de personal. A més a més, els seus comentaris i suggeriments de millora han estat realment essencials per la correcta execució del treball.

En segon lloc, vull agrair a la Noemí Serra, la persona que m'ha acompanyat i dirigit la part especialment la pràctica del treball. Sense el seu temps i ajut, hauria estat gairebé impossible dur a terme els protocols i els càlculs que eren necessaris.

També vull esmentar el meu agraïment a l'Anabel, la tècnica de laboratori de la unitat de fisiologia i a la Roser, la tècnica de laboratori de la unitat de recerca de lípids i arterioesclerosi. Elles m'han permès l'elaboració del treball a les instal·lacions de les seves unitats i m'han ajudat en qualsevol aspecte quan se'ls ha demanat el favor.

Finalment, agrair a la meva família per tot el seu suport durant aquest procés. Els seus ànims m'han donat força per seguir endavant i poder així obtenir un bon treball.

En resum, vull agrair a totes les persones que han contribuït d'alguna manera a la realització d'aquest treball fi de grau. Les seves aportacions han estat essencials per aconseguir els objectius plantejats i concloure'l de forma satisfactòria.

# ÍNDEX

<b>1. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>6</b>
1.1. Impacte mediambiental del plàstic. Context històric.....	6
1.2. Descripció i producció mundial dels microplàstics i nanoplàstics.....	7
1.3. Additius i co-contaminants dels plàstics.....	7
1.4. Distribució mediambiental dels microplàstics i nanoplàstics.....	9
1.5. Fonts d'exposició humana a microplàstics i nanoplàstics.....	11
1.6. Vies d'exposició humanes a microplàstics i nanoplàstics.....	13
1.6.1. Exposició per via oral.....	13
1.6.2. Exposició per via inhalatòria.....	14
1.6.3. Exposició per via dèrmica.....	15
1.7. Impacte dels microplàstics i nanoplàstics sobre la salut.....	16
1.8. Efectes dels microplàstics i nanoplàstics sobre la salut cardiovascular.....	17
<b>2. HIPÒTESI I OBJECTIUS.....</b>	<b>19</b>
2.1. Hipòtesi.....	19
2.2. Objectius.....	19
<b>3. MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>20</b>
3.1. Materials.....	20
3.2. Mètodes.....	20
3.2.1. Cultiu cel·lular i preparació dels nanoplàstics de poliestirè.....	20
3.2.2. Viabilitat cel·lular.....	21
3.2.3. Estrès oxidatiu.....	22
3.2.3.1. Extracció de proteïna.....	22
3.2.3.2. Activitat enzimàtica de la superòxid dismutasa.....	23
3.2.3.3. Activitat enzimàtica de la catalasa.....	24
3.3. Estadística.....	24
<b>4. RESULTATS .....</b>	<b>25</b>
4.1. Efectes dels nanoplàstics de poliestirè a les HUVEC.....	25
4.2. Efectes dels nanoplàstics de poliestirè a les HCASMC.....	28
<b>5. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>32</b>
<b>6. CONCLUSIÓ.....</b>	<b>35</b>

## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1. IMPACTE MEDIAMBIENTAL DEL PLÀSTIC. CONTEXT HISTÒRIC.

Els plàstics són materials d'origen orgànic i d'elevat pes molecular constituïts per un conjunt de llargues cadenes de molècules anomenades polímers i que es produeixen principalment a partir del petroli i del gas natural. Les propietats d'aquest material són difícils de generalitzar degut al seu gran ventall, tot i això es podria dir que les més representatives són: conductivitat elèctrica, conductivitat tèrmica, resistència mecànica, resistència química, combustibilitat i plasticitat [\(1\)](#).

La classificació dels plàstics es divideix en tres tipologies segons la disposició en l'espai de les macromolècules: termoplàstics, termoestables i elastòmers. Els anomenats en primer lloc, són els més comuns, les seves molècules es troben disposades lliurement a l'espai; com a termoplàstics podem trobar: polietilè (PE), polièster saturat (PES), poliestirè (PS), polivinils (PV) i polipropilè (PP). Per altra banda, els plàstics termoestables presenten les seves molècules en forma de xarxa de malla tancada, fet que fa que siguin deformables només una vegada, dins d'aquesta tipologia trobem: fenols, amines, resines de polièster, resines d'epòxid. Per últim, les macromolècules dels elastòmers s'ordenen formant una xarxa de malla amb pocs enllaços, obtenint així una gran elasticitat. Dins dels elastòmers trobem al cautxú, els neoprens, els poliuretans i les silicones [\(1\)](#).

La producció industrial a gran escala de plàstics es remunta, aproximadament, a la dècada de 1950 [\(2\)](#). A partir d'aquí la producció ha anat en augment fins a obtenir xifres anuals, com ara 368 milions de tones registrades al 2019 a nivell global [\(3\)](#). Els plàstics tenen un impacte substancial en gairebé tots els aspectes de la nostra vida quotidiana incloent-hi la tecnologia, la medicina i els respectius tractaments (per exemple: envasos per medicaments, implants mèdics, xeringues, bosses de transfusió...), i els usos domèstics (per exemple: envasos d'aliments, utensilis de cuina, electrodomèstics, joguines...). La majoria de plàstic utilitzat, és llençat pels usuaris després del seu primer ús [\(3\)](#). Aquestes quantitats immenses de residus plàstics que es generen dia rere dia, provoquen una greu contaminació global, la qual reverteix en un preocupant problema de salut pública i ambiental. El fet de produir plàstic i els seus conseqüents residus en excés, genera una balança que encara trobem totalment descompensada degut a l'insuficient procés de reciclatge d'aquest material en molts països [\(3\)](#). La majoria dels plàstics

mostren una notable resistència a la seva degradació i són capaços de persistir en el medi ambient per centenars d'anys [\(4\)](#).

La situació empitjora quan es produeix la degradació dels macroplàstics (> 5 mm) ja que dona lloc a la formació de petites partícules conegudes com a microplàstics (MPs) i nanoplàstics (NPs). En les últimes dècades, aquests polímers de mida més reduïda estan sent detectats en múltiples ambients, amb una presència particularment destacada en els ecosistemes terrestres i aquàtics. La seva facilitat per dispersar-se en diversos ecosistemes ha portat a considerar els MPs i NPs com a contaminants de creixent preocupació [\(5\)](#).

## 1.2. DESCRIPCIÓ I PRODUCCIÓ MUNDIAL DELS MICROPLÀSTICS I NANOPLÀSTICS

Els MPs i NPs són petites partícules sintètiques que mesuren < 5 mm [\(6\)](#) i < 0.1 µm, respectivament [\(7\)](#). Aquestes partícules les trobem classificades segons si la seva font és d'origen primari o secundari. Quan parlem de MPs o NPs primaris, ens referim a aquells procedents de productes fabricats per a una aplicació industrial, com ara vectors de medicaments, o per a un ús domèstic com és el cas dels productes cosmètics, pastes de dents o productes de neteja, entre d'altres [\(8\)](#). Per altra banda, els microplàstics i nanoplàstics (MNPs) secundaris són aquells que en un passat formaven part de macroplàstics, han patit un procés de descomposició (per exemple: radiació ultraviolada, onades, vent, temperatura...) i consegüentment han acabat adoptant un mida més reduïda [\(9\)](#).

Aquestes partícules de plàstic s'han convertit en una preocupació ambiental de gran rellevància en les últimes dècades. S'ha estimat que al 2015 es van generar entre 60-99 milions de tones de deixalles de MPs a tot el món, i s'ha calculat que per a l'any 2060 podríem estar parlant d'una triplicació d'aquesta xifra, podent arribar als 155-260 milions de tones de residus d'aquest material a nivell mundial [\(10\)](#). Els polímers que més s'utilitzen per a la fabricació d'envasos de plàstic i, en conseqüència, trobats com a deixalles són el PP, PE, PS, politereftalat d'etilè (PET) i policlorur de vinil (PVC) [\(11, 12\)](#).

## 1.3. ADDITIUS I CO-CONTAMINANTS DELS PLÀSTICS

Una preocupació òbvia sobre la contaminació per partícules plàstiques és si aquesta representa una amenaça per als ecosistemes i la salut humana. Tanmateix, això encara genera una incertesa considerable. Els efectes nocius sobre els organismes exposats a MPs es poden dividir en dues categories: efectes físics i efectes químics. Els primers estan relacionats amb la mida, la forma i la concentració dels MPs, i els segons, estan relacionats amb les substàncies químiques i

perilloses associades als MPs. Els MPs poden contenir dos tipus de substàncies químiques: additius i matèries primeres de polímers (com ara monòmers o oligòmers) originats del plàstic, i substàncies químiques absorbides del medi ambient (13).

Els additius, també anomenats com productes químics endògens, són productes químics afegits durant el procés de la fabricació del plàstic per donar-li diverses propietats com ara el color, la transparència, rigidesa, mal·leabilitat i allargar la seva vida útil (13, 14). Els additius més utilitzats en diferents tipus de materials polimèrics són: plastificants, retardants de flama, antioxidants, eliminadors d'àcids, estabilitzadors de llum i calor, lubricants, pigments, agents antiestàtics, composts lliscants i estabilitzadors tèrmics (15, 17). Cadascun d'ells juga un paper diferent en les propietats funcionals finals d'un producte de plàstic. Els químics endògens, gairebé en tots els casos, no es troben units químicament als polímers de plàstic. Només alguns retardants de flama es polimeritzen amb les molècules de plàstic, passant a formar part de la cadena polimèrica. Tot i que la seva funció sigui millorar les propietats dels productes polimèrics, la majoria d'ells són tòxics i el seu potencial per contaminar el medi ambient és alt (15). Es sap que algunes substàncies químiques endògenes tenen propietats toxicològiques com els ftalats, el bisfenol A (BFA) el nonifenol (NF) i els retardants de flama bromats (BFR). Per aquesta raó, les taxes de lixiviació d'aquests additius dels MPs degradats són motiu de preocupació per l'ecosistema (14).

Una vegada les micropartícules plàstiques ingressen al medi ambient, majoritàriament absorbeixen un còctel químic que inclou, els contaminants orgànics hidrofòbics (COH), com ara hidrocarburs aromàtics policíclics (HAP) i bifenils policlorats (BPC), també els metalls traça i productes farmacèutics (14, 16). A tots ells se'ls anomena substàncies químiques exògenes, les quals s'han trobat formant part de l'estructura de MPs recollits de l'ambient (14). Aquests químics tenen una major afinitat pel plàstic que per l'aigua, per tant, als oceans els MPs seran un imant de químics exògens (17). Un gran nombre d'estudis s'han plantejat la possibilitat de que els MPs actuïn com a potencials vectors de químics exògens (18, 19). De tal manera que se'ls atribueix la capacitat d'alterar la distribució ambiental dels contaminants adherits mitjançant el seu transport. A més, estudis que engloben l'impacte dels vectors, informen que els MPs tenen el potencial d'alterar les interaccions entre contaminants i la biota, tant a nivell de l'organisme com a nivell cel·lular (18).

És de gran importància mencionar que s'ha demostrat que els MPs són fàcilment ingerits per una àmplia gamma d'organismes. Per aquesta raó i per altres vies d'exposició, és necessari fer una exhaustiva avaluació dels riscos dels MPs com a vehicles químics (18, 19).

#### 1.4. DISTRIBUCIÓ MEDIAMBIENTAL DELS MICROPLÀSTICS I NANOPLÀSTICS

Els MPs i NPs, tant els tipus primaris com els secundaris, poden arribar als diferents ecosistemes a través de nombroses vies.

En els ecosistemes terrestres podem trobar els MNPs primaris, els quals són produïts directament per finalitats industrials específiques (medicaments, ús domèstic, cosmètica...). Aquesta tipologia de plàstics, poden ingressar al terra a través de fonts com ara les plantes de tractament d'aigua, on els MNPs es podrien dipositar als camps agrícoles i contaminar l'aigua potable (20). S'ha calculat que l'aplicació de fangs en l'agricultura contribueix a l'addició anual d'entre 125 i 850 tones de MPs per milió d'habitants en el sòl europeu. A més, segons diversos estudis, els MPs del sòl afecten la presència de carboni, nitrogen i fòsfor, fet que pot modificar el cicle dels nutrients (21). Les assecadores i rentadores també són fonts de contaminació de fibres de MNPs secundàries, aquestes poden acabar als camps agrícoles a través de les plantes de tractament d'aigües. Aquestes fibres sintètiques també poden propagar-se al ser transportades per l'aire des d'abocadors i posteriorment depositar-se als sistemes terrestres i al sòl (22). Els polímers de tipus secundari poden produir-se al terra degut a la degradació ambiental de peces de macroplàstics, incloent l'abrasió en la superfície del terra per l'acció de la fauna del terra, com ara cucs, àcars, així com mamífers excavadors (22). A banda de l'esmentat anteriorment, també mencionar que el desgast dels pneumàtics dels automòbils també contribueix a la contaminació per MNPs (23).

Les fonts terrestres de MNPs contribueixen en un 80-90% a la contaminació de plàstics de l'aigua. Productes de plàstic com ara bosses, ampolles, articles d'higiene personal, materials de construcció i roba, acaben la seva vida en medis aquàtics (Fig. 1) (23). Les instal·lacions d'incineració de plàstic, també afavoreixen a aquesta contaminació des de terra ferma alliberant cendres que contenen micropartícules plàstiques (Fig. 2) (24). Les plantes de tractament d'aigües residuals i activitats industrials, particularment aquelles que fan ús de grànuls i petits pellets de resina, són altres fonts d'emissió de MPs en entorns aquàtics (23). Cal considerar també als productes cosmètics i de cura personal com a potencials contaminants, ja que a les seves composicions pot haver-hi presència de MPs (25). Les fibres sintètiques a part de contaminar el sòl, també poden colonitzar el medi aquàtic a través d'aigües residuals. A més a més dels factors

anomenats anteriorment, és important no deixar de banda el paper contaminant plàstic derivat de medicaments i diferents materials emprats per a la construcció [\(23\)](#).

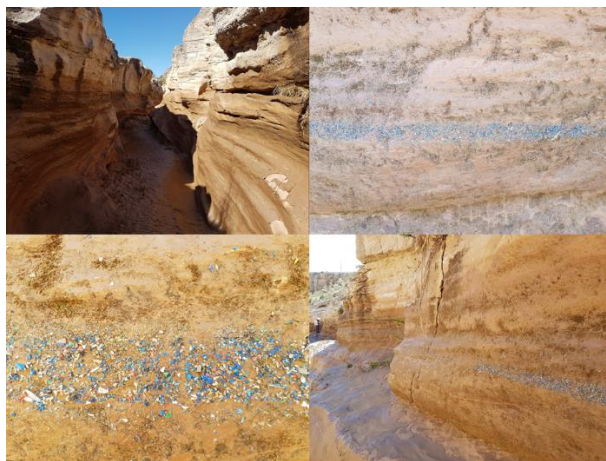
La contaminació del medi aquàtic seria representada en un 10-20% per les fonts de contaminació oceàniques. La navegació i la pesca llencen al mar residus plàstics en grans quantitats. S'ha registrat que anualment s'aboquen als oceans 2.963 km<sup>2</sup> de xarxes de pesca, 739.583 km de palangres i més de 25 milions de trapes [\(26\)](#). A més, una quantitat massiva de residus que contenen plàstics provinents de les indústries costaneres, com ara les petroquímiques, s'alliberen als ecosistemes marins [\(27\)](#). Finalment, incloure el turisme marítim com a font contaminant dels ecosistemes marins [\(23\)](#).

Tot i que la contribució de les fonts oceàniques a la contaminació de MPs no és tant alta com la de les fonts terrestres, segueix sent significat. S'han d'establir estratègies de control per reduir aquesta contribució [\(23\)](#).

També existeix evidència de què els MPs i NPs es troben en suspensió en l'ambient atmosfèric, fet que potencialment contamina els ecosistemes mitjançant la pluja [\(28\)](#). Anualment, entre 3 i 10 tones de MNPs es dipositen com a conseqüència de la pluja atmosfèrica [\(3\)](#).

La mida d'aquestes partícules és tan reduïda que els processos de filtratge i els tractaments de les aigües residuals no són capaços d'extreure aquests polímers. El llarg període de desintegració que presenten aquests materials, és una de les característiques més preocupants. A part d'aquestes característiques, els MNPs són excepcionalment lleugers, gairebé indestructibles i capaços de flotar.

Tenint en compte totes les vies que disposen aquestes partícules per passar a formar part dels ecosistemes i afegint-hi les característiques físiques que presenten, són els candidats per excel·lència per colonitzar cada racó del planeta Terra [\(3, 29\)](#).



**FIGURA 1:** Línies de deixalles de plàstic incrustades en un riu sec al sud d'Espanya [\(13\)](#).



FIGURA 2: El cicle vital dels plàstics (24)

### 1.5. FONTS D'EXPOSICIÓ HUMANA A MICROPLÀSTICS I NANOPLÀSTICS

La creixent acumulació de MNPs al medi ambient resulta realment preocupant ja que no només afecta a la fauna i la flora, sinó que també representa un risc significatiu per a la salut humana. A la següent secció s'exploraran les diverses fonts de MNPs a les quals els humans poden estar exposats.

Gràcies a l'evidència científica està demostrat que els MPs i NPs entren a la cadena alimentària de diverses maneres: per contaminació plàstica durant el procés d'elaboració; pel consum d'aquestes partícules per part dels animals, quan aquests es troben en entorns naturals; i/o mitjançant el desprendiment dels polímers presents en envasos de plàstic d'aliments i begudes (3).

En el cas dels organismes marins, la bioacumulació de MPs en el tracte digestiu dels peixos no ha de ser la major preocupació pels humans, ja que no s'acostuma a consumir. El fet de real importància és la bioacumulació en els crustacis, que s'alimenten per filtració i es consumeix el tracte digestiu (21). Fins i tot, gràcies a l'estudi realitzat per Karami A. (30) s'ha demostrat que els MPs també es poden trobar en productes en conserva, en el cas de l'estudi en qüestió, es van determinar partícules de MPs en 4 marques de sardines i espadins enllaunats.

Els aliments que es consideren majors portadors de MNPs i que per tant, més contaminen la dieta humana són: sal de taula, bosses de te, menjar d'origen marí, llet i mel (3, 17, 31).

La informació disponible sobre la contaminació d'espècies no marines o aquàtiques es troba en menor proporció que les que pertanyen al medi marí. Tot i això, cada vegada sorgeixen noves investigacions en les que els objectius s'encaminen a l'avaluació de nous aliments bàsics com ara, arròs, vinagre, vi, begudes energètiques... (21).

En l'àmbit de la Seguretat Alimentària s'ha generat una gran preocupació envers aquesta situació de contaminació MNPs del medi (6, 17). Actualment, el fet de que certs aliments continguin aquestes partícules ja s'ha identificat com un risc emergent en la Unió Europea. Tot i això encara no existeix cap legislació, ni a nivell nacional ni a nivell europeu, que reguli la presència d'aquests contaminants en els aliments. Fins que es disposi d'aquesta legislació, és crucial que les empreses agroalimentàries i els governs continuïn monitoritzant i gestionant aquest risc, així com promovent pràctiques sostenibles per reduir la contaminació deguda als plàstics a les fonts i en la producció d'aliments (6).

Estudis recents han detectat aquestes partícules plàstiques en aigua potable de diversos països i en ampolles d'aigua mineral (4). L'origen de MNPs en aigua potable és variat, tot i això, una font important de contaminació són les plantes de tractament d'aigües residuals (20, 23) Un estudi realitzat a Madrid, va concloure s'aboquen 300 milions de residus plàstics (25 µm - 50 mm) al riu Henares procedents d'una planta de tractament d'aigua d'alta eficiència (>90%). Aquesta fet s'atorga a la gran densitat plàstica i la petita mida que adopten els MNPs (32). En països subdesenvolupats, és molt probable que la situació sigui pitjor segons la OMS (33), xifres aproximades d'un 67% representen a la població d'aquests països que no té a l'abast connexions a aigües subterrànies. A més, al voltant d'un 20% de les aigües residuals domèstiques que desemboquen en les plantes de tractament d'aigües residuals, no reben ni tan sols un tractament secundari (20).

Actualment, diferents estudis confirmen que els MNPs es troben presents tant en aigua procedent de l'aixeta com en aigua embotellada de diversos països, com ara Alemanya i la Xina (34, 35). Un estudi referent a l'aigua embotellada, va trobar partícules de MNPs (5-20 µm) en ampolles de plàstic retornables (28-241 partícules/L), en ampolles de plàstic d'un sol ús (2-44 partícules/L) i en ampolles de vidre (0-253 partícules/L) (35). Aquest fet mostra que els envasos de plàstic desprenen MNPs que acaben contaminant encara més l'aigua, ja que per si sola ja ve contaminada per altres fonts.

L'evidència científica que hi ha fins a dia d'avui no permet extrapolar els resultats sobre la contaminació de MNPs a l'aigua potable a escala mundial. Encara no es pot afirmar si el contingut de MNPs és més elevat a l'aigua de l'aixeta o embotellada. Per poder definir un límit de tolerància a la contaminació per plàstic a l'aigua potable, encara es necessiten establir mètodes estàndards i de qualitat assegurada per així poder obtenir dades comparables. A més a més, es necessita obtenir més informació sobre la seva possible absorció i el destí dels MNPs al cos humà (36).

L'aire presenta també contaminació per MNPs, les fonts principals es consideren els tèxtils sintètics, l'erosió dels pneumàtics de cautxú sintètic i la pols urbana [\(28\)](#). En un estudi recent de MNPs en superfícies, es va demostrar que les concentracions de MPs i NPs aeris més altes estan presents en ambients interiors (1,0–60,0 fibres/m<sup>3</sup>), que a l'aire lliure (0,3-1,5 fibres/m<sup>3</sup>) [\(28\)](#). Els treballadors de la indústria poden ser els més afectats per aquestes partícules aèries, ja que es troben exposats a altes concentracions, fet que deriva en malalties professionals. Les indústries amb més risc de patir malalties pulmonars degudes a l'alta exposició plàstica són les indústries tèxtil sintètiques, flocats, i de clorur de vinil o policlorur de vinil. Els autors van suggerir que, la inhalació no hauria de ser la principal via d'entrada al cos humà degut a la mida de les partícules; malgrat això, van observar una deposició significativa en forma de pols (190-670 fibres/mg) i van suggerir la possibilitat d'ingesta oral, particularment en infants [\(28\)](#).

A banda de l'esmentat anteriorment, els productes de salut i bellesa també constitueixen una font clau d'exposició. Dins la seva composició trobem presents les partícules plàstiques anomenades microperles, les quals estan patentades des del 1980 [\(21\)](#). Les microperles s'utilitzen com abrasius en cosmètics inclosos els exfoliants i sabons com ara: gels de dutxa, protectors solars, escumes d'afaitar, xampús, cremes per la pell i maquillatge líquid. A part dels productes anomenats anteriorment, també es classifiquen els següents ítems com a portadors de microperles: blanquejadors i colorants pel cabell, locions corporals, productes per la cura dels llavis i les ungles i desodorants [\(37\)](#).

## 1.6. VIES D'EXPOSICIÓ HUMANES A MICROPLÀSTICS I NANOPLÀSTICS

Els humans poden incorporar aquestes partícules a l'organisme a través de la ingesta, la inhalació i l'exposició dèrmica.

### 1.6.1. EXPOSICIÓ PER VIA ORAL

Una de les principals vies d'exposició humana als MNPs és la via oral. Aquesta es produeix a través de la ingesta d'aliments i begudes contaminades, així com pel consum d'aigua potable que conté partícules plàstiques.

Actualment, hi ha un nombre considerable d'evidència científica que estudia l'exposició de MPs en el tracte gastrointestinal d'animals o en models *in vitro*. Però és realment escàs el nombre d'estudis que investiguen la ruta que segueixen els MNPs un cop entren dins del tracte gastrointestinal [\(2\)](#).

Es sap que la mida màxima dels porus intestinals és de 1.5 nm per tant es considera poc probable que els MNPs puguin travessar la barrera intestinal [\(2\)](#). Tot i això, els MNPs de menor mida si que

tindrien aquesta possibilitat, ja que podrien danyar la membrana plasmàtica causant un deteriorament de la barrera intestinal. Per altra banda, poden estar capacitats per alterar la senyal dels receptors de la superfície cel·lular i alterar l'expressió genètica al nucli. Existeixen altres especulacions d'altres possibles vies d'entrada a l'organisme humà que comporten l'activació del sistema immunològic innat i la producció de espècies reactives d'oxigen (ROS). Els MNPs passarien al torrent circulatori si la barrera intestinal-vascular es troba atrofiada o, podria succeir per via transcitosi, arribant així a altres òrgans [\(38\)](#).

Estudis realitzats en ratolins, que administraven injeccions dins de la cavitat peritoneal, van observar que els macròfags peritoneals fagocitaven partícules de polimetacrilat i poliestirè de mides de 1, 5 i 12 µm. Tot i això, els resultats d'estudis que investiguen l'absorció a través del tracte gastrointestinal en ratolins, mostren uns valors mínims d'absorció, situant-se entre 0.04%-0.3% [\(2\)](#).

L'estudi realitzat per Fournier E, et al. [\(39\)](#) ha estat el primer en investigar l'impacte d'una exposició de 2 setmanes a MP de PE en una dosi rellevant en l'ecosistema digestiu humà en adults. Aquesta exposició repetida, pot promoure el desenvolupament de patobionts humans perillosos (per exemple: *Desulfovibrionaceae* i *Enterobacteriaceae*, presents tant en el compartiment luminal com en el mucós) i a la vegada disminuir el nombre de bacteries beneficioses (per exemple: *Christensenellaceae* i *Akkermansiaceae* de la microbiota de la mucosa). No es va informar cap impacte significatiu causat pels canvis en els metabòlits microbians intestinals a la barrera de muc/epitelial en termes de permeabilitat i inflamació [\(39\)](#).

En un altre estudi realitzat per Tamargo A, et al. [\(40\)](#) els resultats van revelar que l'exposició de la microbiota del colon humana a MPs de PET va disminuir els grups microbians essencials pel correcte equilibri de la microbiota intestinal i va augmentar diferents grups bacterians proinflamatoris relacionats amb malalties. Per tant, l'homeòstasi intestinal es podria veure alterada. En aquest estudi es van utilitzar polímers de polietilè tereftalat sense additius. Com que els MPs habituals i els que provenen del medi ambient contenen una llarga llista d'additius, els efectes adversos sobre la microbiota intestinal encara estan per definir [\(40\)](#).

#### 1.6.2. EXPOSICIÓ PER VIA INHALATÒRIA

Després de la ingesta de les partícules plàstiques, trobem la inhalació d'aquestes com una ruta evident d'exposició humana [\(41\)](#).

La superfície alveolar dels pulmons és molt ampla, presenta al voltant d'uns 150 m<sup>2</sup> i compta amb una barrera de teixit extremadament fina, de menys d'1 µm d'espessor. Aquesta fina

barrera permet que les nanopartícules la travessin i arribin al sistema sanguini, la qual cosa significa que puguin distribuir-se per tot l'organisme (2). Les partícules <1 µm poden incrustar-se profundament en el pulmó o emigrar a altres parts de l'organisme (2, 41). La inhalació de NPs pot causar diferents respostes que dependran de la mida, càrrega, densitat i tipus de partícula/fibra, a més del factor individual (42). Algunes de les reaccions que el nostre organisme pot posar en marxa són les reaccions bronquials immediates, fibrosis intersticials difuses i granulomes amb inclusions de fibres, inflamatòries i fibròtiques. En casos greus pot arribar a provocar bronquitis crònica i pneumotòrax (2). Aquestes situacions són influenciades especialment pels canvis de les partícules causats en el medi ambient, les transformacions fisicoquímiques i els recobriments (eco-corones) que adquireixen els plàstics durant la meteorització (42).

### 1.6.3. EXPOSICIÓ DÈRMICA

Una altra via d'exposició humana a MNPs és el contacte dèrmic. Les partícules de plàstic poden ingressar a la pell a través de productes de salut i bellesa, així com per contacte amb aigua contaminada de partícules plàstiques (3).

La capa dèrmica més externa es coneix com estrat corni, el qual desenvolupa un paper crucial en la protecció de la pell al formar una barrera defensiva eficaç contra partícules i patògens en un estat saludable (43). Aquest estrat està compost per corneòcits envoltats per capes de lípids hidròfils que inclouen ceramida, àcids grassos lliures de cadena llarga i colesterol (3). Les partícules de plàstic poden ingressar a la pell a través de productes de salut i bellesa, així com per contacte amb aigua contaminada de partícules plàstiques (3). Un estudi *in vivo* realitzat per Schirinzi et al. (44) mostra que l'exposició cutània a MNPs indueix estrès oxidatiu en les cèl·lules epitelials. El fet de que els MNPs siguin de caràcter hidrofòbic, en el cas dels humans fa que sigui poc probable que es puguin absorbir a través de l'estrat corni i arribar a capes profundes, tot i això poden depositar-se en la epidermis (45). Per altra banda, aquestes partícules si que podrien absorbir-se a través de glàndules sudorípares, ferides en la pell, fol·licles pilosos o glàndules sebàcies. (3, 43).

## 1.7. IMPACTE DELS MICROPLÀSTICS I NANOPLÀSTICS SOBRE LA SALUT

Diversos estudis han detectat MNPs en diverses mostres humanes, com ara placenta, femta, colon, pulmó, fetge, llet materna i sang. Tot i això, no es poden establir correlacions degut a certes limitacions dels estudis. Actualment, la toxicitat dels MNPs pels humans és un tema que requereix més investigacions al respecte per poder abordar-lo correctament [\(46\)](#).

La permanència dels MNPs al sistema digestiu humà després de l'exposició als aliments, així com els seus potencials impactes en la salut, incloent el risc de malalties malignes, encara no es poden comprendre al complet. Tot i això, ja s'ha demostrat que les espècies marines que ingereixen MNPs experimenten efectes gastrointestinals adversos (per exemple: inflamació i estrès oxidatiu (EO) en el peix zebra) [\(46\)](#). Aquest fet també és recolzat per estudis realitzats amb animals, els quals proporcionen una il·lustració clara de les conseqüències de la toxicitat intestinal [\(38\)](#). Si això succeís realment, la integritat de la barrera intestinal-vascular es podria veure compromesa, fet que facilitaria l'entrada de MNPs a la circulació sanguínia, permetent el seu accés al fetge a través de la vena porta. La factibilitat d'aquest procés s'ha demostrat en alguns models de ratolí. L'acumulació perllongada d'aquestes partícules plàstiques en els teixits hepàtics juntament amb la inflamació crònica podrien desencadenar malalties hepàtiques i problemes metabòlics.

En el cas de l'acumulació de MNPs al pulmó, es produeix una resposta inflamatòria local i es permet que les partícules plàstiques entrin al sistema circulatori i limfàtic mitjançant els macròfags (Fig. 3) [\(46\)](#). A llarg termini, es podrien donar lloc trastorns pulmonars crònics [\(38\)](#).

En els estudis de ratolins, un dels fets més comuns, és la disbiosi de la microbiota intestinal. S'ha establert una connexió entre els canvis de la microbiota intestinal i diverses malalties cròniques que afecten altres òrgans, com ara malalties renals, del sistema cardiovascular, inflamatòries, càncer i trastorns neurològics [\(38\)](#).

Alguns estudis també han informat que les proteïnes sanguínies interactuen amb els MNPs per formant complexes proteïna-plàstic. Aquests complexos en grans quantitats podrien ser capaços de provocar una obstrucció dels vasos sanguinis [\(38\)](#). D'aquesta manera l'endoteli vascular es veuria afectat negativament, de fet, hi ha evidència que indica que els NPs produeixen envelliment prematur de les cèl·lules epitelials vasculares i la disfunció de les mateixes [\(47\)](#).

Aquestes són només algunes complicacions a nivell cardiovascular de les moltes que es poden arribar a produir degut a la presència de MNPs al torrent sanguini (per exemple: velocitat sanguínia anormal, freqüència cardíaca alterada, disfunció endotelial...) [\(48\)](#).

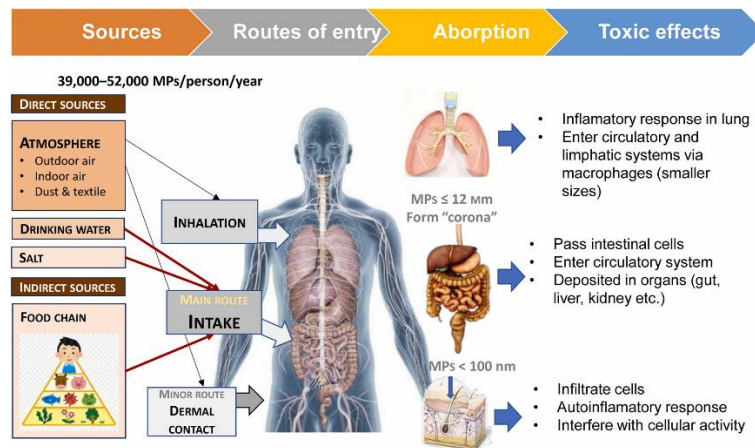


Figura 3: Possibles vies i rutes d'exposició a MNPs i possibles efectes tòxics en humans (46).

## 1.8. MALALTIA CARDIOVASCULAR

Les malalties cardiovasculars són la causa líder de mort a nivell mundial. La xifra aproximada de morts per malalties coronaries al 2019 va ser de 17.9 milions, la qual representa un 32% del total de morts al món (WHO, 2021) (49). Els principals factors de risc poden ser no modificables (sexe, edat, factors genètics) o modificables, els quals s'han d'abordar de forma preventiva: hipertensió arterial (HTA), tabaquisme, hipercolesterolèmia, diabetis mellitus (DM), sobrepès/obesitat i consum d'alcohol (50). Actualment, s'han identificat factors de risc nous, com ara patrons dietètics poc saludables, estils de vida sedentaris i contaminació de l'aire (48). A més, l'emergent evidència científica ha associat l'exposició potencialment elevada a MNPs i factors de risc cardiovascular. Les partícules plàstiques podrien passar a formar part de la circulació sanguínia a través de l'exposició per via inhalatòria, oral i dèrmica, depenent de la mida que presentin. Podran infiltrar-se en l'epiteli intestinal ( $\leq 150 \mu\text{m}$ ), en els vasos sanguinis ( $\leq 10 \mu\text{m}$ ) i en la barrera sanguínia pulmonar ( $< 400\text{nm}$ ). Les cèl·lules de Langerhans poden captar NP més petits (40 nm), per altra banda partícules de mida més gran ( $6.8 \mu\text{m}$ ) podrien ser capaces de produir un bloqueig mecànic als capil·lars que envolten al cor (48).

La toxicitat que produeixen els MNPs a nivell cardíac inclou freqüència cardíaca anormal, deteriorament de la funció cardíaca, edema pericàrdic, fibrosi miocàrdica i altres danys patològics cardíacs. A més a més, també podrien causar toxicitat en punts (micro)vasculars, com hemòlisi, trombosi, coagulació sanguínia i dany endotelial vascular (48).

L'endoteli vascular és una monocapa que separa els teixits de la sang i recobreix així tot el sistema circulatori. Però la funció de les cèl·lules endotelials va molt més enllà, realitzen la filtració de líquids, mantenen el to dels vasos sanguinis, l'hemostàsia, fan el reclutament de neutròfils i regulen el tràfic d'hormones (51). Els MNPs de menys de  $150 \mu\text{m}$ , després de creuar

barreres biològiques, poden filtrar-se al torrent sanguini a través de la vena porta. D'aquesta manera, les cèl·lules endotelials vasculars són una diana bastant probable de contacte directe amb els MNPs. S'ha demostrat que aquestes partícules produeixen danys a l'endoteli vascular, generant així diverses alteracions cardiovasculars, com ara l'afectació del factor de creixement endotelial vascular, de la interacció de les cèl·lules endotelials vasculars amb la sang i les cèl·lules immunes, aparició d'inflamació... (Fig. 4) (48).

Els principals mecanismes responsables d'aquestes alteracions són l'EO, inflamació, apoptosi, piroptosi i interacció amb cèl·lules i components cel·lulars. A nivell clínic, s'ha observat que els MNPs són factors de risc potencials d'arítmia, aterosclerosi, infart de miocardi i altres malalties cardiovasculars (48).

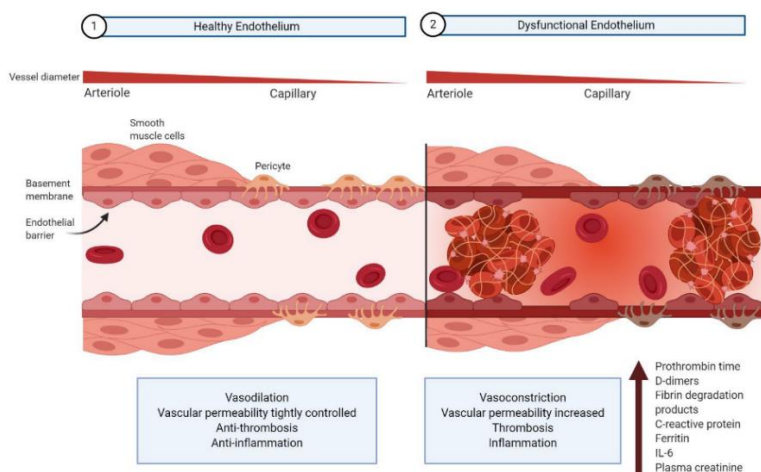


Figura 4: Endoteli vascular sa i disfuncional (52)

Destacant el paper de l'EO, aquest és responsable de l'increment de la producció de ROS, el que resulta en canvis bioquímics, moleculars i fisiològics. El metabolisme endogen genera ROS com a part de les seves funcions normals, i aquestes poden causar dany si no es controlen correctament. L'exposoma, que inclou totes les influències externes com la contaminació atmosfèrica, la dieta, el tabaquisme, l'estil de vida, els productes químics, entre d'altres, també afecta a la producció de ROS i a les defenses antioxidants de l'organisme. Així, tant els processos interns com les exposicions externes influeixen en els processos biològics a través de les xarxes redox, i un desequilibri pot conduir a l'EO, el qual està relacionat amb diverses malalties cròniques (53). No obstant, gairebé la totalitat de les cèl·lules presenten mecanismes de defensa específics per fer front a les ROS i garantir l'homeòstasi cel·lular. Aquesta compensació generalment es realitza amb l'ajut dels enzims antioxidants, la superòxid dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), glutatió reductasa (GR) i el glutatió peroxidasa (GPX) es consideren els enzims més rellevants per eliminar les ROS induïdes per oxidació dins la cèl·lula (54).

## **2. HIPÒTESI I OBJECTIUS**

L'augment significatiu de la producció de plàstic i consegüentment les seves deixalles, genera una creixent preocupació global pels seus efectes adversos, tant al medi ambient com en la salut humana. És de particular interès l'exposició dels humans als MNPs a través de la ingesta dels aliments i begudes, ja que la via oral no presenta tants sistemes de protecció envers aquests contaminants. En canvi, a través de la inhalació ja existeixen mesures protectores com ara mascaretes. Existeix evidència científica creixent que suggereix que els MNPs poden ser absorbits a través de les barreres intestinals cap a la circulació sanguínia. Tenint en compte aquestes observacions, una de les principals dianes dels MNPs, una vegada absorbits per l'intestí, és la paret vascular, la qual juga un paper crucial sobre la salut cardiovascular.

### **HIPÒTESI**

La via oral representa una important font d'exposició a NPs a través de la ingesta d'aliments i begudes contaminades per aquests agents. Els NPs, que són de mida més petita, poden creuar la barrera intestinal, accedir al torrent circulatori i lesionar la paret dels vasos sanguinis. A la llarga, aquesta alteració de la vasculatura pot acabar derivant en patologies cardiocirculatòries.

### **OBJECTIU GENERAL**

Poder avaluar els efectes adversos de l'exposició als NPs en diferents models cel·lulars de la paret vascular.

### **OBJECTIUS ESPECÍFICS**

- Avaluar la viabilitat de l'exposició de nanoplàstics de poliestirè (NPs-PS) en una línia cel·lular endotelial (HUVEC) i muscular (HCASMC).
- Estudiar diferents marcadors d'estrès oxidatiu en les HUVEC i les HCASMC.
- Determinar el grau d'afectació segons el model cel·lular.

### **3. MATERIALS I MÈTODES**

#### **3.1. MATERIALS**

Es van adquirir el model de NPs-PS 43302-5ML-F de 100 nm de Sigma Aldrich. Les cèl·lules endotelials de vena umbilical humana (HUVEC) i les cèl·lules del múscul llis de l'artèria coronària humana (HCASMC) es van adquirir de Thermo Fisher Scientific. El medi basal de creixement de les cèl·lules HUVEC (REF M-200-500) i suplement de creixement per les mateixes cèl·lules es va adquirir a Gibco. El medi basal de creixement de les cèl·lules HCASMC (REF M-231-500) i el suplement de creixement per les mateixes cèl·lules es va adquirir a Gibco.

#### **3.2. MÈTODES**

##### **3.2.1. CULTIU CEL·LULAR I PREPARACIÓ DE NANOPLÀSTICS DE POLIESTIRÈ**

En primer lloc es va preparar el medi de cultiu per cada tipus de cèl·lula (10% sèrum i 1% antibiòtic). El medi es va obrir sota la campana, prèviament net amb solució asèptica (70% etanol). En el cas de les HUVEC, es van afegir al medi 50 ml de suplement de creixement en sèrum (LSGS), anteriorment descongelat i seguidament, se li va afegir 1 ml de amfotericina/gentamicina (500X). En el cas de les HCASMC, es van afegir al medi 50 ml de suplement de creixement en sèrum (SMGS), anteriorment descongelat, i seguidament se li va afegir 1 ml de amfotericina/gentamicina (500X). Ambdós medis complets es van conservar tapats amb paper d'alumini, a 4°C i a les fosques.

Una vegada completada la preparació dels medis complets, es va procedir a descongelar les cèl·lules, que es trobaven a -196.5 °C conservades en nitrogen líquid. Les cèl·lules HUVEC estaven en una concentració de 750.000 cèl·lules/vial (1 ml) i les cèl·lules HCASMC estaven en una concentració de 900.000 cèl·lules/vial (1 ml). Es va engegar el bany a 37°C i es van descongelar les cèl·lules al bany maria.

En el cas de les HUVEC, es va preparar un primer tub de 15 ml amb 3 ml de medi complet. Una vegada les cèl·lules s'havien descongelat, es va extreure 1 ml del vial de cèl·lules HUVEC, es va afegir al tub de 15 ml i es va barrejar amb una pipeta Pasteur. En un segon tub de 15 ml, es va afegir 1 ml del tub anterior i 2 ml de medi complet (es va barrejar amb la pipeta Pasteur). Finalment, a un tercer tub de 50 ml se li va afegir 1 ml de l'últim tub de 15 ml i 14 ml de medi complet. D'aquesta manera es va obtenir una concentració final de 4.166,67 cèl·lules/ml.

En el cas de les HCASMC, a la vegada que es descongelaven les cèl·lules, es va preparar un primer tub de 15 ml amb 3 ml de medi complet. Una vegada les cèl·lules s'havien descongelat, es va extreure 1 ml del vial de cèl·lules HUVEC, es va afegir al tub de 15 ml i es va barrejar amb una pipeta Pasteur. En un segon tub de 15 ml es va afegir 1 ml del tub anterior i 3 ml de medi complet (es va barrejar amb la pipeta Pasteur). Finalment, a un tercer tub de 50 ml se li va afegir 1 ml de l'últim tub de 15 ml i 14 ml de medi complet. D'aquesta manera es va obtenir una concentració final de 3.750 cèl·lules/ml.

Les cèl·lules es van cultivar a una incubadora humidificada amb CO<sub>2</sub> al 5%. Es va canviar el primer medi a les 24h i seguint el protocol de la casa comercial la resta de canvis realitzaven dia si dia no fins que es va arribar al 80% de confluència.

El vial obtingut de la casa comercial té una densitat d'origen de 1.05 g/ml. A partir d'aquesta concentració, es va preparar la solució mare de 10 ml (100 µg partícules/ml medi). D'aquesta solució i tenint en compte els protocols que es van fer servir per l'estudi, es van preparar les diferents concentracions a testar:

- 5 µg/ml → 1.5 ml solució mare + 28.5 ml medi
- 10 µg/ml → 3 ml solució mare + 27 ml medi
- 25 µg/ml → 1.25 ml solució mare + 3.75 ml medi

### 3.2.2. VIABILITAT CEL·LULAR

La viabilitat cel·lular es va determinar amb la finalitat de valorar si l'exposició a NPs-PS de 100 nm, a diferents concentracions (0, 5, 10, 25 µg/ml) i temps d'exposició (0, 24, 48, 72 hores), indueix la mortalitat cel·lular i per tant afecta negativament a la funció cel·lular. Determinar aquest fet, és crucial per comprendre els possibles impactes tòxics dels NPs-PS al sistema cardiovascular humà.

La viabilitat cel·lular es va mesurar mitjançant l'assaig de bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli (MTT) (Fig. 5). Es van incubar les cèl·lules en plaques de 96 pous, cal que estiguin en una concentració de 2500 cèl·lules/cm<sup>2</sup>, per tant a cada pou es van sembrar unes 825 cèl·lules. A les cèl·lules se les va sotmetre a NPs-PS de 100 nm de diàmetre de diferents concentracions (0, 5, 10, 25 µg/ml) durant 0, 24, 48 i 72 h. Els medis de cultiu es canviaven tots els dies. Després del període d'incubació, es van afegir 10 µl del reactiu de marcatge MTT a cada pou de la placa a tractar. Seguidament es va incubar la microplaca durant 4 h en una atmosfera humidificada (37°C, CO<sub>2</sub> al 5%). Passat aquest temps, es van afegir 100 µl de la dissolució de solubilització a cada pou. La placa en qüestió es va deixar reposar tota la nit a la incubadora (37°C, CO<sub>2</sub> al 5%).

Finalment es va llegir l'absorbància espectrofotomètrica a 570 nm amb el lector de plaques Synergy HT (Biotek Winooski, VT, USA). La longitud d'ona per mesurar l'absorbància del producte és de 550 a 600 nm i la longitud d'ona de referència ha de ser superior a 650 nm (55).

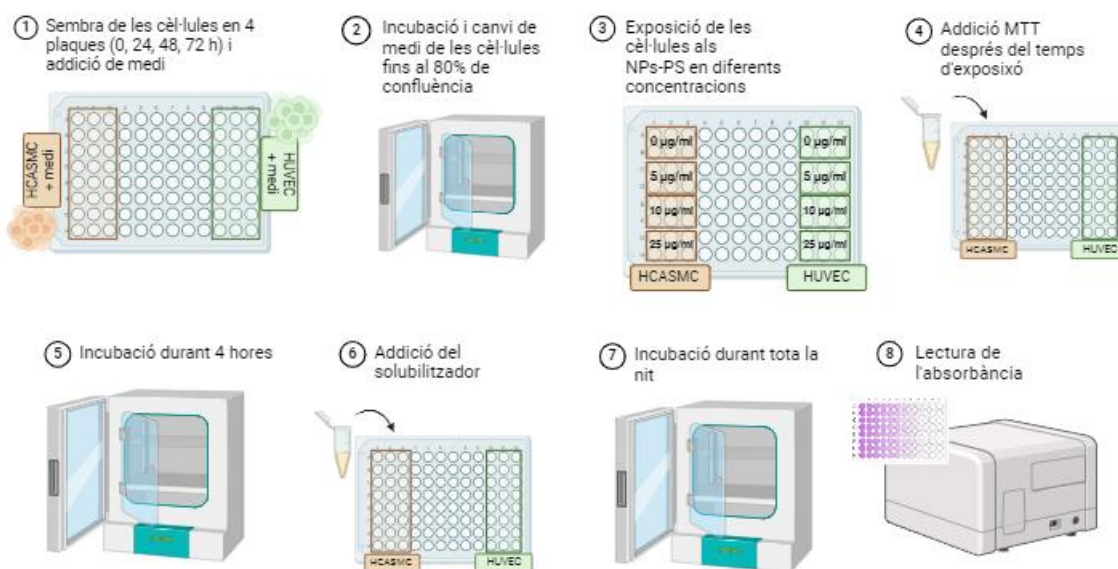


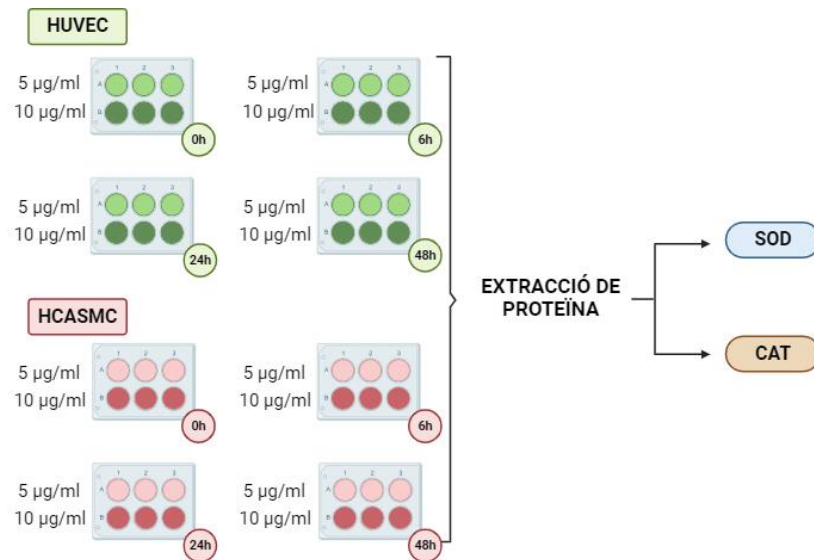
Figura 5: Fases de l'assaig MTT per avaluar la viabilitat cel·lular.

### 3.2.3. ESTRÉS OXIDATIU

#### 3.2.3.1 QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNA

La finalitat del procediment experimental següent és poder extreure la quantitat de proteïna generada dins les cèl·lules exposades a NPs-PS. Aquest pas és crucial abans de realitzar el protocol experimental de la SOD i la CAT ja que aquests enzims antioxidants juguen un paper fonamental en la defensa cel·lular contra l'estrès oxidatiu.

Per tal de procedir al l'extracció de proteïna es van sembrar les cèl·lules en plaques de 6 pous. Es van necessitar 4 plaques per cada tipus de cèl·lula, cada placa tenia un temps d'exposició diferent (0, 6, 24, 48 h). Les cèl·lules van incubar-se en una atmosfera humidificada (37°C, CO<sub>2</sub> al 5%), el medi de les plaques es canviava cada dia fins arribar al 80% de confluència. En una mateixa placa, els 3 pous superiors corresponien a la concentració 5 µg/ml i els 3 pous inferiors corresponien a la concentració 10 µg/ml (Fig. 6).



**Figura 6:** Esquema de la distribució de les plaques per l'obtenció de proteïna

Per extreure la proteïna del citoplasma de les cèl·lules es va dur a terme mitjançant l'assaig del tampó RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS). Les plaques es van dipositar sobre gel mentre s'eliminava el medi de la placa. Seguidament es van realitzar 2 rentats de les cèl·lules amb 1 ml de PBS fred i es van afegir 75 µl de la solució RIPA. Es va raspar la base dels pous per desprendre les cèl·lules i es va recollir tot en eppendorfs de 1.5 ml. Es van incubar amb gel 30 minuts, mentre es sotmetien a vòrtex cada 5-10 minuts. Un cop passat aquest temps, es va centrifugar a 16000 g, 4 °C, 10 minuts. Es va recuperar el sobrenedant en un tub nou i es va eliminar el pellet. Les mostres es van conservar a -80 °C i va servir tan per realitzar la determinació de l'enzim SOD i com per la CAT.

Per poder realitzar els càlculs de l'estrès oxidatiu, es va haver de mesurar la quantitat de proteïna de les mostres obtingudes. Aquesta mesura es va realitzar llegint l'absorbància espectrofotomètrica d'una porció de cada mostra al lector de plaques Synergy HT (Biotek Winooski, VVT, USA).

### 3.2.3.2. ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE LA SUPERÒXID DISMUTASA

La determinació de l'activitat de SOD es basa en l'autooxidació d'epinefrina per anió superòxid. Es va preparar un tampó carbonat EDTA a pH10.2, HCl 1mM i epinefrina 6 mM en HCl. Per cada mostra es va preparar un blanc (2,5 ml tampó, 300 µl aigua destil·lada i 200ul HCl), epinefrina (2,5 ml tampó, 300 µl aigua i 200 µl epinefrina) i es van realitzar 4 dilucions de cada mostra (2,5 ml tampó + 8, 10, 15 i 30 µl de cada mostra + 292, 290, 285 i 270 µl d'aigua + 200 µl d'epinefrina). Finalment es va fer una lectura cinètica durant 15 min a 480 nm a l'espectrofotòmetre Perkin Elmer UV/VIS.

L'activitat enzimàtica es va expressar com la quantitat d'enzim necessària per inhibir l'autooxidació de l'epinefrina en un 50%. Els resultats s'expressen en unitats/g de proteïna.

### 3.2.3.3. ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE LA CATALASA

La determinació de l'activitat de la CAT es basa en l'extinció del substrat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a causa de l'acció de la CAT.

Primer es va preparar tampó fosfat potàssic 100mM i pH 7.5. Seguidament, per preparar la H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es van afegir 50 ml de tampó a un erlenmeyer, es van treure 119 µl de tampó i aquests, es van substituir per 119 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Per cada mostra es va fer una dilució 1:2 amb el tampó fosfat, es van posar 830 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 170 µl de mostra en la cubeta. Finalment es va mesurar l'activitat de la CAT durant 1 min a 240 nm a l'espectrofotòmetre Perkin Elmer UV/VIS.

Es calcula el decrement/minut i els resultats s'expressen en µmol/min/mg proteïna.

## 3.3. ESTADÍSTICA

Les dades van ser expressades com a mitjanes. Degut a que les dades no eren paramètriques, es va utilitzar la prova de *Kruskal-Wallis* i, posteriorment, el test de comparació múltiple de *Dunn*. Es van comparar tots els grups experimentals amb els controls i entre ells. El nivell de significació estadística de totes les proves es va establir en  $p < 0,05$ . Totes les dades es van analitzar mitjançant el programa *GraphPad Prism Statistical Analysis* (GraphPad Prism versió 5.01 per a Windows).

## 4. RESULTATS

### 4.2. EFECTES DELS NANOPLÀSTICS DE POLIESTIRÈ A LES HUVEC

Els models cel·lulars que es volen estudiar en aquest treball es van sotmetre a l'assaig MTT per tal de determinar la seva viabilitat. En el model de les HUVEC es van obtenir unes dades que mostren que aquestes cèl·lules no van ser afectades en termes de viabilitat cel·lular per les concentracions i temps d'exposició emprats. És a dir, en cap dels temps d'exposició (0, 24, 48, 72 h) ni de les concentracions de NPs-PS de 100 nm (0, 5, 10, 25 µg/ml) es va produir indicatiu de mortalitat en aquesta tipologia cel·lular (Fig. 7).

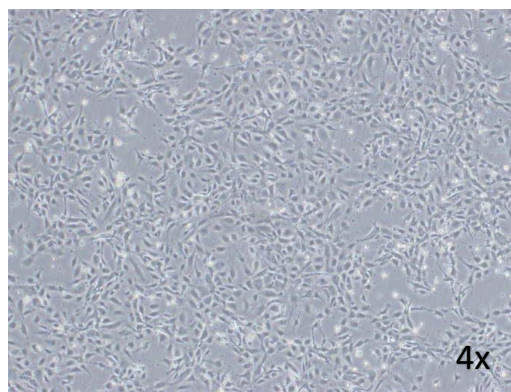


Figura 7: HUVEC

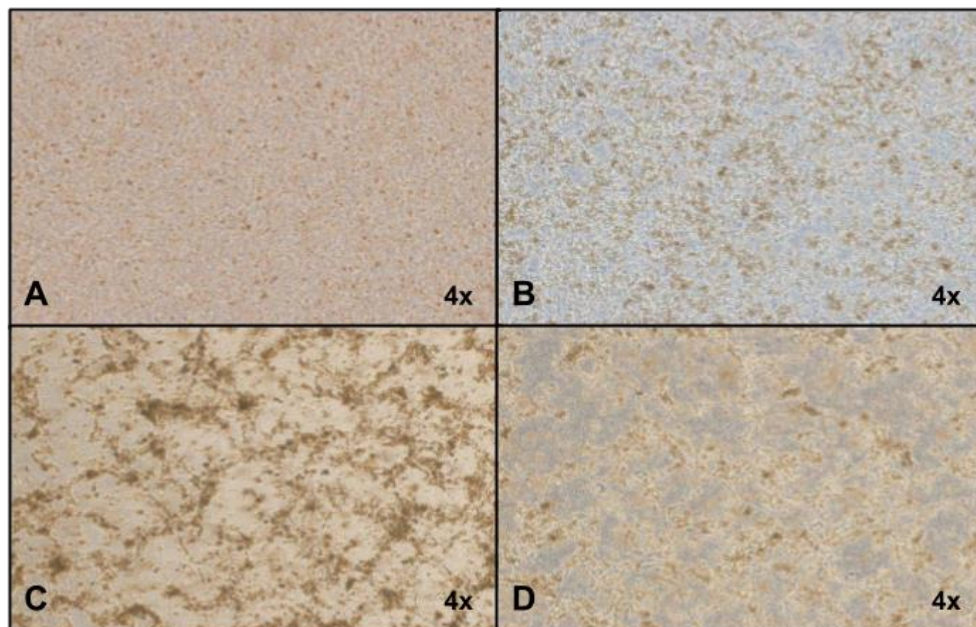


Figura 8: HUVEC. **A:** 5 µg, 0h; **B:** 5 µg, 6h; **C:** 5 µg, 24h; **D:** 5 µg, 48h

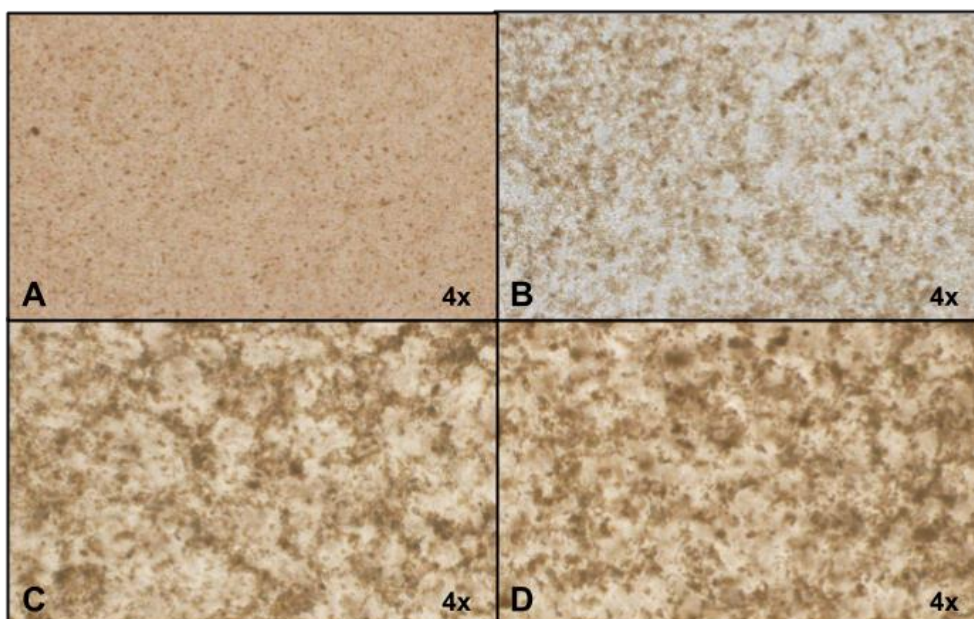


Figura 9: HUVEC. A: 10 µg, 0h; B: 10 µg, 6h; C: 10 µg, 24h; D: 10 µg, 48h

A la Figura 8 i la Figura 9 es pot observar que amb l'augment del temps d'exposició, s'incrementen les taques negres. Aquestes ombres fosques es corresponen amb els plàstics, que a mesura que passa el temps van colonitzant la imatge, és a dir, es van dipositant lentament a la base del pou i conseqüentment, la superfície de contacte dels NPs-PS amb les cèl·lules augmenta. Tot i això, observant aquestes imatges no es pot determinar el grau d'internalització dels NPs-PS a les cèl·lules. També cal destacar la comparació de les concentracions al mateix temps d'exposició, ja que s'observa una major quantitat de NPs-PS a les imatges corresponents a la concentració de 10 µg (Fig. 9) respecte a les de 5 µg (Fig. 8).

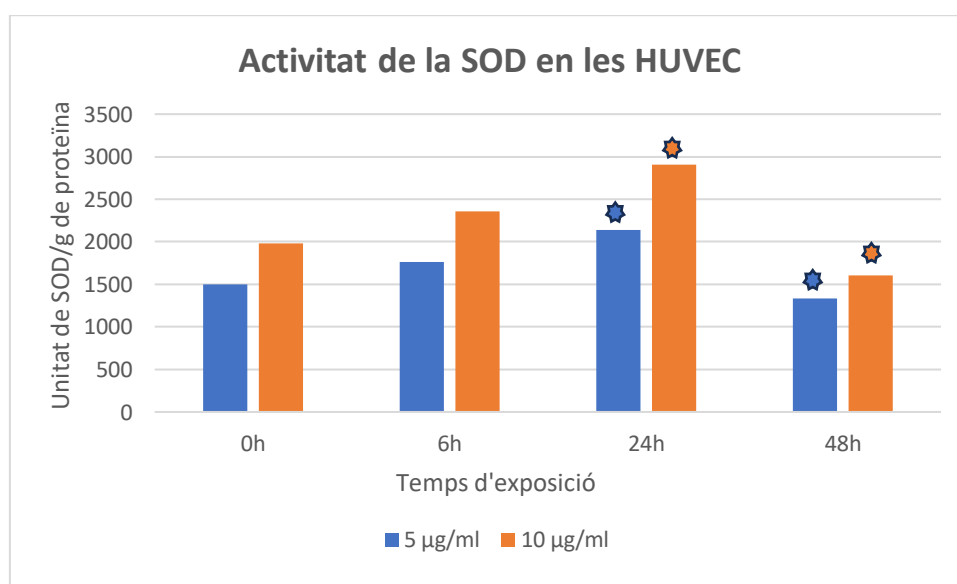
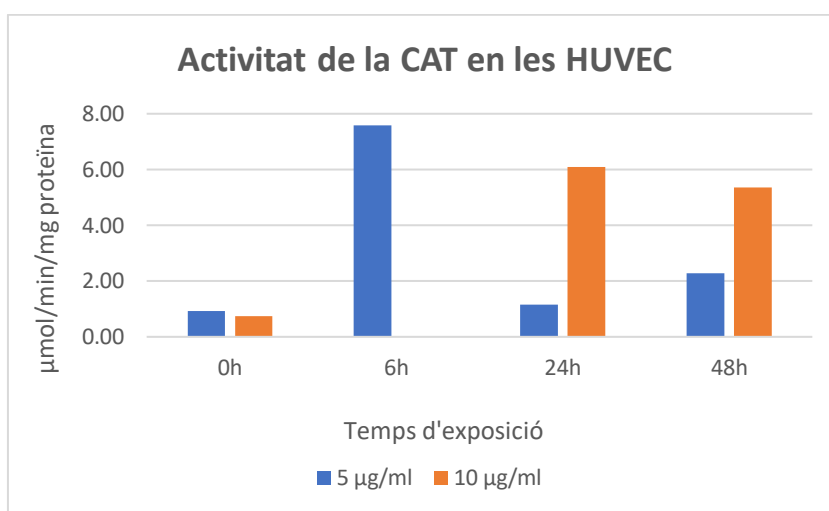


Figura 10: Activitat de la SOD en les HUVEC.

La Figura 10 mostra l'activitat de la SOD en les HUVEC exposades a les diferents concentracions de NPs-PS de 100 nm (5 µg/ml i 10 µg/ml) i als diferents temps d'exposició (0, 6, 24, 48h). Les diferències no són significatives entre les hores d'exposició ni entre les diferents concentracions de NPs-PS, excepte la comparativa entre les 24 i 48h de les HUVEC exposades a 5 µg/ml i les 24 i 48h de les exposades a 10 µg/ml. Tot i no obtenir un total de significança, es mostra un mateix patró de comportament de l'activitat de la SOD en les cèl·lules HUVEC. Els 3 primers temps d'exposició (0, 6, 24h) presenten un augment progressiu de l'activitat d'aquest enzim i seguidament, les 48 hores mostren una disminució d'aquesta activitat. Aquest patró es mostra tant a les HUVEC exposades a NPs-PS 5 µg/ml, com a les exposades a 10 µg/ml. Tot i això, si comparem els valors de cada concentració de NPs-PS per separat es veu amb claredat que els valors d'activitat de la SOD són més elevats en el cas de les cèl·lules exposades a 10 µg/ml que els obtinguts de les cèl·lules exposades a 5 µg/ml.



**Figura 11:** Activitat de la CAT en les HUVEC.

La Figura 11 representa l'activitat de la CAT en les HUVEC exposades a les diferents concentracions de NPs-PS de 100 nm (5 µg/ml i 10 µg/ml) i temps d'exposició (0, 6, 24, 48 hores). Tot i que totes les comparatives de valors entre grups no presentin diferències significatives, podem veure que la CAT ha estat activada a les cèl·lules HUVEC per les diferents concentracions de NPs-PS. En aquest cas l'enzim no segueix un patró clar de comportament. En el cas de les HUVEC exposades a NPs-PS de 5 µg/ml, el pic d'activitat màxima de la CAT s'obté a les 6 hores, mentre que els temps d'exposició restants presenten una fluctuació de l'activitat de l'enzim. Observant les columnes de la gràfica corresponent a l'exposició cel·lular de NPs-PS de 10 µg/ml també es destaca una fluctuació dels resultats. Malgrat la manca del valor a les 6 hores d'exposició, no s'impedeix confirmar l'activació de la CAT dins la cèl·lula.

### 4.3. EFECTES DELS NANOPLÀSTICS DE POLIESTIRÈ A LES HCASMC

La figura 9 mostra les viabilitats cel·lulars relatives de les HCASMC, mesurades amb l'assaig MTT, representades amb % de mortalitat cel·lular, després de l'exposició a les concentracions seriades de NPs-PS de 100 nm (0, 5, 10, 25 µg/ml) durant 0, 24, 48 i 72 h.

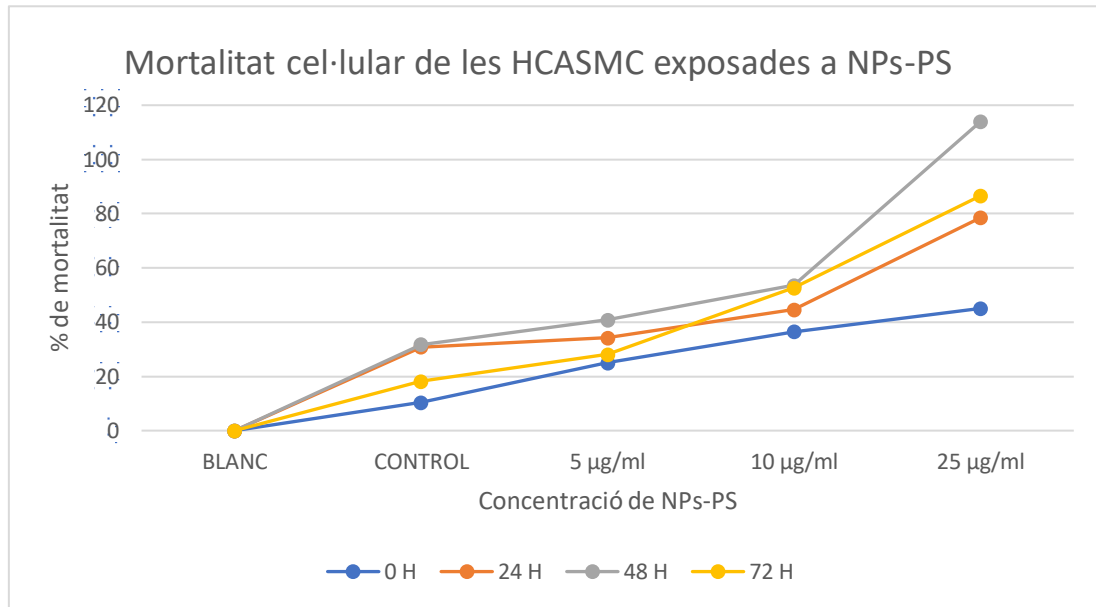


Figura 12: % Mortalitat de les HCASMC. Les HCASMC es van exposar a concentracions en sèrie (0, 5, 10, 25 µg/ml) durant 0, 24, 48 i 72 h.

Al gràfic (Fig. 10) s'observa una tendència clara d'un augment de la mortalitat de les HCASMC a mesura que s'incrementa la concentració de NPs-PS i el temps d'exposició. A les 48h és quan es detecten xifres de mortalitat cel·lular més elevades respecte el control.

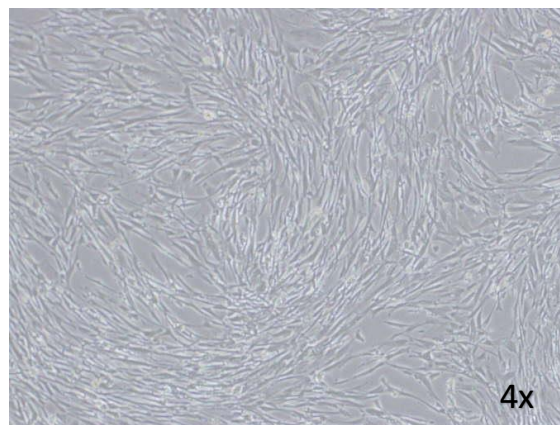


Figura 11: HCASCM

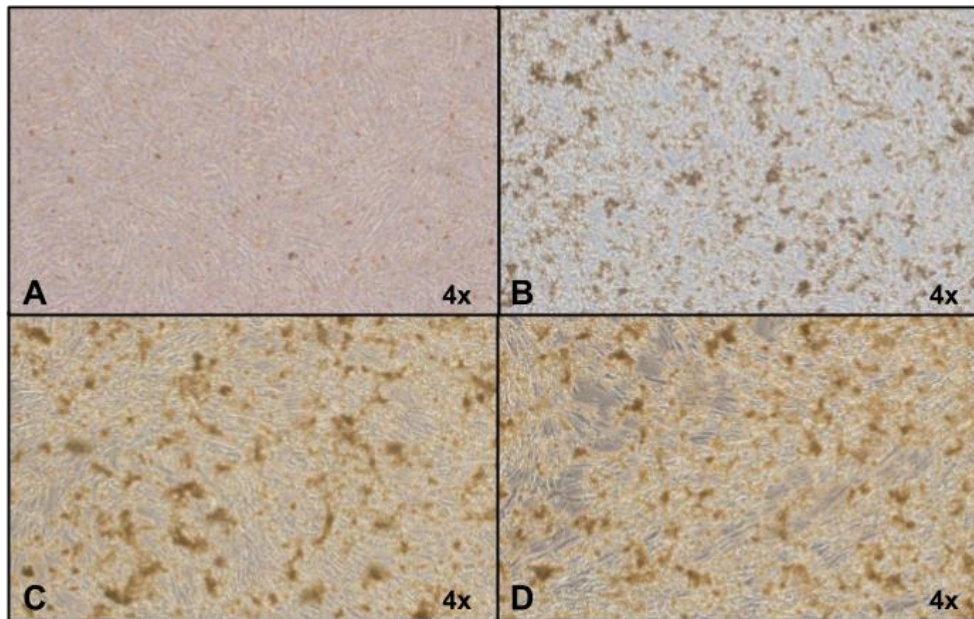


Figura 13: HCASMC. **A:** 5 µg, 0h; **B:** 5 µg, 6h; **C:** 5 µg, 24h; **D:** 5 µg, 48h

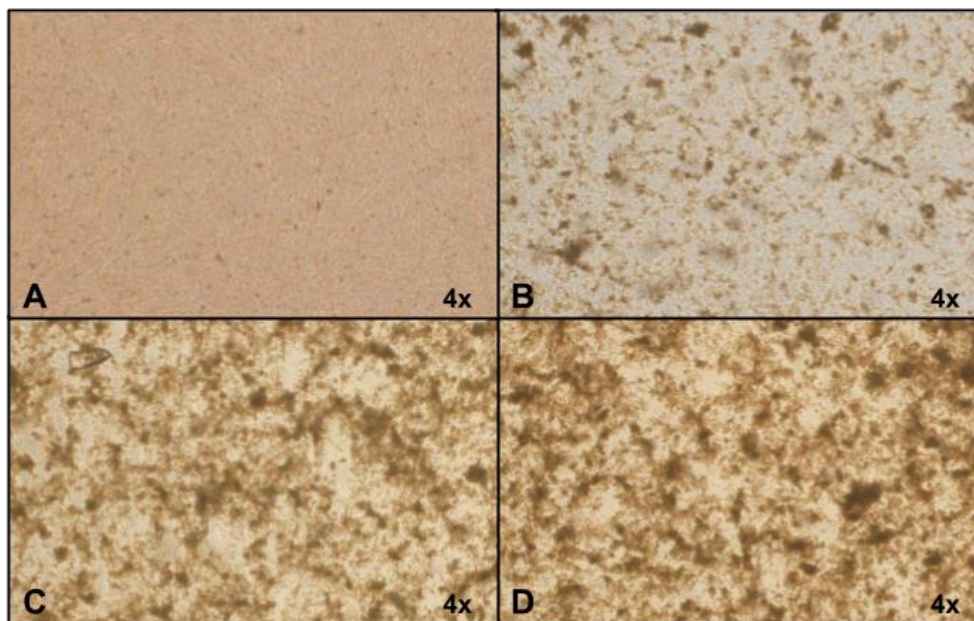
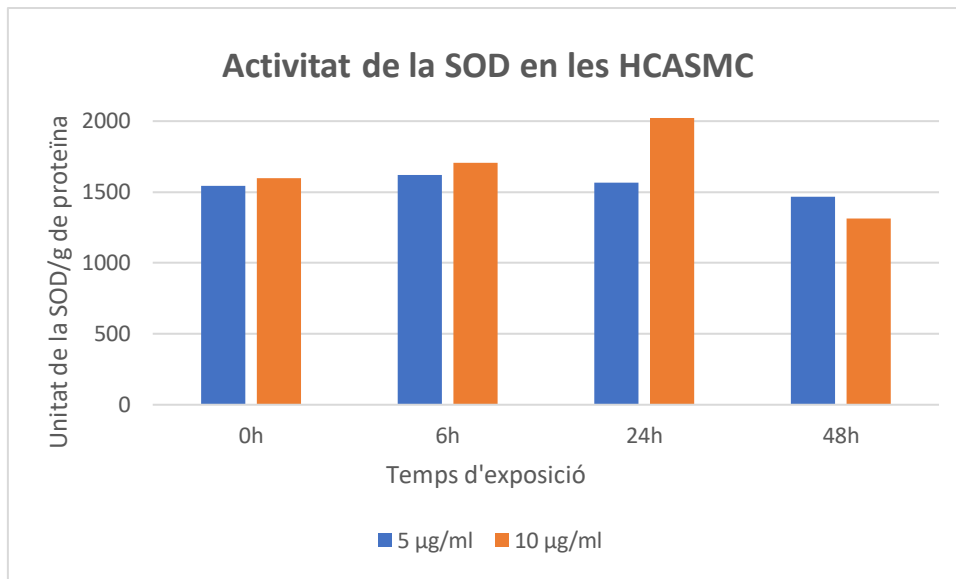


Figura 14: HCASMC. **A:** 10 µg, 0h; **B:** 10 µg, 6h; **C:** 10 µg, 24h; **D:** 10 µg, 48h

El cas de les HCASMC és semblant al de les HUVEC, a la Figura 13 i la Figura 14 es veu com a mesura que avança el temps, les taques negres també augmenten, per tant, trobem més plàstics dipositats a la base del pou i en contacte directe amb les cèl·lules. Si comparem les concentracions entre elles al mateix temps d'exposició, podem observar una major quantitat de NPs-PS a les imatges corresponents a la concentració de 10 µg (Fig. 14) respecte a les de 5 µg (Fig. 13). Cal comentar que l'observació d'aquestes figures no permet determinar el grau d'internalització dels NPs-PS dins les cèl·lules.

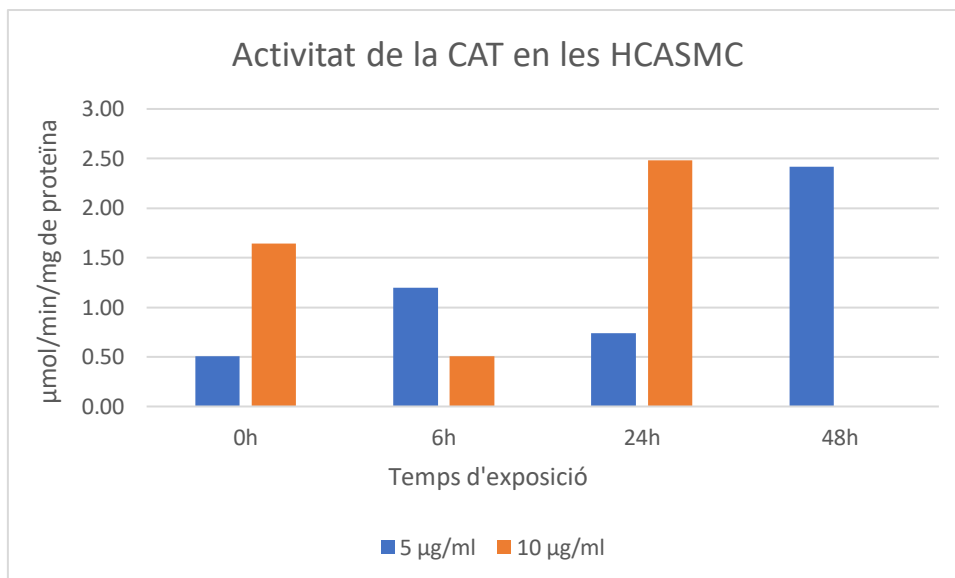


**Figura 15:** Activitat de la SOD en les HCASMC.

La Figura 15 il·lustra l'activitat de la SOD en les HCASMC exposades a les diferents concentracions de NPs-PS de 100 nm (5 µg/ml i 10 µg/ml) i durant diversos temps d'exposició (0, 6, 24, 48 hores).

Les comparatives entre grups del mateix temps i diferents concentracions (5 µg/ml i 10 µg/ml) no mostren diferències significatives. Això també passa si comparem els grups de les mateixes concentracions 5 µg/ml o 10 µg/ml entre els diferents temps d'exposició. Encara que la significança sigui inexistent, al gràfic podem observar una tendència per a cada concentració. En el cas de les HCASMC exposades a NPs-PS de 5 µg/ml el pic d'activitat de la SOD és a les 6 hores i després s'observa un decreixement del mateix enzim. En canvi, si observem el gràfic corresponent a les HCASMC exposades a 10 µg/ml, el pic d'activitat de la SOD es situa a les 24 hores, i seguidament també es produeix un decreixement.

No obstant, si es comparen els valors de cada concentració de NPs-PS per separat, es veu que els valors d'activitat de la SOD són més elevats en les cèl·lules exposades a 10 µg/ml en comparació amb les exposades a 5 µg/ml.



**Figura 16:** Activitat de la CAT en les HCASMC.

Els valors d'activitat de la CAT en les HCASMC, exposades a NPs-PS de 100 nm a concentracions de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  i 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  i en diferents temps d'exposició (0, 6, 24, 48 hores), es troben representats a la Figura 16. Cap de les comparacions de valors entre diferents grups presenta alguna diferència significativa. Tot i això, es pot confirmar que la CAT ha estat activada després d'exposar les cèl·lules a NPs-PS (Fig. 16). En el cas de les cèl·lules exposades a NPs-PS de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , s'observa una fluctuació de l'activitat de la CAT, obtenint el pic màxim a les 48 hores. En canvi, si ens fixem en els valors obtinguts de les HCASMC exposades a NPs-PS de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , també s'evidencia una fluctuació. El pic màxim de la concentració en qüestió, no es pot confirmar degut a que no es va poder obtenir un valor corresponent a les 48 hores. Tot i això, com abans s'ha comentat, això no impedeix confirmar que l'exposició de les cèl·lules als NPs-PS de les dues concentracions, ha produït una activació de l'enzim CAT.

## 5. DISCUSSIÓ

Els plàstics, com bé s'ha descrit a la introducció del treball, són materials omnipresents a la vida quotidiana moderna. Actualment han generat preocupació a escala mundial a causa de la seva persistència al medi ambient i els seus efectes potencials sobre la salut humana. Els NPs, una fracció més petita dels MPs, plantegen nous reptes i interrogants pel que fa a la seva detecció, toxicitat i impacte sobre la salut i el medi ambient.

Tot i que la recerca dels efectes sobre NPs en el medi ambient i la salut està evolucionant ràpidament, la majoria d'estudis fins ara s'han centrat en els MPs, deixant una comprensió limitada sobre els NPs. No obstant això, s'estan desenvolupant noves tècniques i metodologies per detectar, identificar i analitzar aquests materials i el seu impacte en els organismes i el medi ambient [\(56\)](#). Un informe futur de la Comissió Europea per al medi ambient, la salut pública i la seguretat alimentària, titulat "Nanoplastics: state of knowledge and environmental and human health impacts" [\(57\)](#), aborda aquest tema des de la detecció de NPs fins a l'anàlisi dels seus possibles riscos per a la salut, així com les seves vies de dispersió i perspectives futures [\(56\)](#).

De moment, els estudis que investiguen els efectes dels NPs a nivell cel·lular són limitats. No obstant, els pocs estudis existents, ja han demostrat alguns dels perills potencials dels NPs envers la salut, i entre aquests, s'ha vist en risc el sistema cardiovascular. Per tant, és de crucial importància avaluar sistemàticament als NPs com a nous factors de risc ambiental i de salut per la toxicitat cardiovascular i les malalties cardiocirculatòries en humans.

Aquest apartat de discussió es centrarà en els resultats obtinguts sobre els efectes dels NPs en les línies cel·lulars estudiades. L'objectiu principal del treball era poder avaluar els efectes nocius adversos de l'exposició als NPs-PS en els diferents models cel·lulars de la paret vascular (HUVEC i HCASM).

Per determinar els efectes nocius dels NPs-PS envers les cèl·lules, per una banda, es va avaluar la viabilitat cel·lular després de sotmetre les HUVEC i les HCASMC a NPs-PS de 100 nm a diferents concentracions (0, 5, 10 i 25 µg/ml) i durant uns períodes d'exposició determinats (0, 24, 48, 72 hores). Per altra banda, es van estudiar diferents marcadors d'estrès oxidatiu (SOD i CAT) en les HUVEC i les HCASM exposades a NPs-PS de 100 nm a 5 i 10 µg/ml i durant 0, 6, 24, i 48 hores.

Els resultats obtinguts, en termes de viabilitat, de les HUVEC estan en línia amb els d'altres investigacions recents. Per exemple, un estudi va demostrar que les NPs-PS de 100 nm i 500 nm, en concentracions de  $\leq 25$  µg/ml, no van tenir cap efecte notable sobre la viabilitat cel·lular. A més les troballes d'aquest estudi, mostren que només els les nanopartícules de  $<100$  nm

s'uneixen a la superfície cel·lular de les HUVEC i posteriorment s'incorporen dins del citoplasma (58). Al present treball, els resultats obtinguts per les HUVEC exposades a NPs-PS de 100 nm van ser concordants. En concret, no es va observar cap indicatiu de mort cel·lular després de l'exposició a les diferents concentracions de 0, 5, 10 i 25 µg/ml de NPs-PS.

Els resultats observats en aquest treball corresponents a les cèl·lules HCASMC, ofereixen una perspectiva interessant respecte altres investigacions sobre l'efecte de les partícules plàstiques en termes de viabilitat cel·lular. Com ara, un estudi recent en el que es va observar que l'exposició de les HCASMC a MPs de PS de 564 µm a una concentració de 1 mg/ml, no va inhibir el creixement cel·lular ni es va observar una pèrdua pronunciada de viabilitat (59). En contrast, en aquest treball es va observar una tendència clara d'augment de la mortalitat de les HCASMC a mesura que s'incrementava la concentració de NPs-PS i el temps d'exposició (Fig. 12). Aquestes observacions suggereixen que els NPs poden tenir un efecte més tòxic en comparació amb els MPs, especialment quan s'augmenta la concentració i el temps d'exposició. Aquesta hipòtesi, està recolzada per les troballes d'una revisió recent que afirma que els NPs definitivament demostren una major citotoxicitat que els MPs (60). En canvi, la citotoxicitat també depèn de la concentració de NPs i/o MPs i del temps d'acció, el factor més crucial sembla ser la mida de la partícula, a menys diàmetre, més citotòxica és la partícula (60).

Els resultats d'aquest treball, combinats amb les troballes d'altres estudis, aporten una visió més completa sobre l'efecte dels NPs-PS en l'activitat enzimàtica i l'EO en les cèl·lules endotelials. En un estudi, no es van observar diferències significatives en la inflamació, l'autofàgia, els nivells de ROS, la lliberació de lactat deshidrogenasa (LDH) i altres paràmetres, després de l'exposició de les HUVEC a PS-MNP de 1 µm per 48 hores, fins i tot a concentracions de 5, 10 i 25 µg/ml (61). Cal comentar també els resultats obtinguts per un estudi que va revelar que els NPs de 50 nm de PS carregats positivament amb NH<sub>2</sub> (10 µg/ml), presentaven una major citotoxicitat per a les HUVEC en comparació amb els NPs-PS no carregats (10 µg/ml). Aquest fet es recolza amb la disminució de la viabilitat cel·lular, l'augment de la generació de ROS i la disminució del potencial de membrana dels mitocondris (62). A més, un nou estudi va mostrar que tant l'activitat eliminadora no enzimàtica (FRAP) com l'activitat de la SOD eren estimulades a les cèl·lules endotelials aòrtiques (AOC) amb totes les dosis de NPs-PS (100 nm) examinades (56).

En el present treball, s'observa un patró similar en l'activitat de la SOD en les HUVEC exposades a NPs-PS de 5 µg/ml i 10 µg/ml, amb un augment progressiu durant els primers temps d'exposició (0, 6, 24h) seguit d'una disminució a les 48 hores. Això coincideix amb la tendència general observada en altres estudis on l'activitat enzimàtica respon a la presència de NPs-PS.

Pel que fa a l'activitat de la CAT, es veu un pic d'activitat màxima a les 6 hores en les HUVEC exposades a 5 µg/ml, mentre que en les exposades a 10 µg/ml es confirma l'activació de la CAT tot i la fluctuació dels resultats. Tenint en compte aquestes dades i les obtingudes amb l'MTT, podem concloure que les HUVEC induïxen una resposta enzimàtica antioxidant efectiva, que fa que es reverteixi aquest estrès oxidatiu i així s'evita la mort cel·lular.

En global, aquestes troballes suggereixen que les NPs poden induir respostes variables d'estrès oxidatiu i citotoxicitat en funció de la seva mida, funcionalitat i càrrega.

En comparar els resultats del present treball amb l'article sobre les HCASMC tractades amb MPs de PS, s'observa una clara relació entre l'EO i la resposta cel·lular a les partícules de plàstic.

Els resultats de l'article mostren una correlació moderada entre el pentà i les ROS, confirmant un possible vincle entre aquestes dues variables quan les HCASMC es tracten amb MPs (1 µm). L'article va especular que les HCASMC no van superar la sobreproducció de ROS, de manera que es va generar una quantitat detectable de peròxid d'hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durant les primeres 72 hores d'exposició [\(59\)](#).

De manera similar, en el present treball, s'ha observat que les HCASMC exposades a NPs-PS de 5 µg/ml i 10 µg/ml mostren una activació significativa de la SOD, un marcador clau de l'estrès oxidatiu. En el cas de les cèl·lules exposades a 5 µg/ml, el pic d'activitat de la SOD es va observar a les 6 hores, seguit d'una disminució progressiva. Per les cèl·lules exposades a 10 µg/ml, el pic d'activitat es va situar a les 24 hores, també seguit d'un decreixement. A més, els valors d'activitat de la SOD eren més elevats en les cèl·lules exposades a 10 µg/ml comparat amb les exposades a 5 µg/ml, indicant una resposta més forta a majors concentracions de NPs-PS.

Pel que fa a l'activitat de la CAT, un altre enzim antioxidant, s'ha observat una fluctuació en l'activitat després de l'exposició a NPs-PS. Per tant, es confirma l'activació d'una resposta cel·lular antioxidant, per combatre l'EO, el qual és generat a conseqüència de l'exposició als NPs-PS de 100 nm en ambdues concentracions (5 µg/ml i 10 µg/ml).

En conjunt, aquestes troballes suggereixen que tant els MPs com els NPs de PS poden induir EO en les HCASMC, tal com es reflecteix en l'activació dels enzims antioxidants SOD i CAT. Tot i aquesta clara activació enzimàtica, les xifres de mortalitat evidencien que la resposta antioxidant per part dels enzims, no va ser suficient per combatre l'EO generat per les nanopartícules. Per tant, cal remarcar l'EO com a mecanisme clau en la citotoxicitat induïda per partícules de plàstic en cèl·lules vasculars.

## 6. CONCLUSIÓ

En conclusió, aquest treball demostra que els NPs-PS de 100 nm provoquen estrès oxidatiu i respostes antioxidant significatives en cèl·lules vasculars HUVEC i HCASMC. Els resultats mostren una activació notable dels enzims antioxidant SOD i CAT, amb una major activitat en les cèl·lules exposades a concentracions més altes de NPs-PS. No obstant, en el cas de les HCASMC no és suficient per prevenir la citotoxicitat, aquest fet s'evidencia per l'increment de la mortalitat cel·lular en les HCASMC a mesura que augmenta la concentració i el temps d'exposició als NPs-PS. En contrast, les HUVEC no mostren una mortalitat cel·lular significativa després de l'exposició als NPs-PS. Aquestes troballes subratllen la importància de continuar investigant els efectes dels NPs en la salut cardiovascular i el paper crucial de l'estrès oxidatiu en la citotoxicitat induïda pels NPs.

## 7. **BIBLIOGRAFIA**

- 1- [https://www3.gobiernodecanarias.org/medusa/ecoblog/rgalman/files/2015/05/3o\\_Plasticos\\_2.pdf](https://www3.gobiernodecanarias.org/medusa/ecoblog/rgalman/files/2015/05/3o_Plasticos_2.pdf)
- 2- Boucher J, Billard G. The challenges of measuring plastic pollution. *Field Actions Sci Rep.* 2019;(Special19):68–75.
- 3- Yee MS-L, Hii L-W, Looi CK, Lim W-M, Wong S-F, Kok Y-Y, et al. Impact of microplastics and nanoplastics on human health. *Nanomaterials (Basel).* 2021;11(2):496.
- 4- Thompson RC, Moore CJ, Vom Saal FS, Swan SH. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences.* 2009 Jul 27;364(1526):2153-66.
- 5- Zhang K, Xiong X, Hu H, Wu C, Bi Y, Wu Y, et al. Occurrence and characteristics of microplastic pollution in xiangxi bay of three gorges reservoir, China. *Environ Sci Technol.* 2017;51(7):3794–801.
- 6- Frias JPGL, Nash R. Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Mar Pollut Bull.* 2019;138:145–7.
- 7- Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición [Internet]. Gob.es. [citado el 5 de noviembre de 2023]. Disponible en: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/ampliacion/microplasticos\\_nanoplasticos.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/microplasticos_nanoplasticos.htm)
- 8- Auta HS, Emenike CU, Fauziah SH. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environ Int.* 2017;102:165–76.
- 9- Xiang Y, Jiang L, Zhou Y, Luo Z, Zhi D, Yang J, et al. Microplastics and environmental pollutants: Key interaction and toxicology in aquatic and soil environments. *J Hazard Mater.* 2022;422(126843):126843.
- 10- Lebreton L, Andrady A. Future scenarios of global plastic waste generation and disposal. *Palgrave Commun.* 2019;5(1):1–11.
- 11- Andrady AL. Microplastics in the marine environment. *Mar Pollut Bull.* 2011;62(8):1596–605.
- 12- Rocha-Santos T, Duarte AC. A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. *Trends Analyt Chem.* 2015;65:47–53
- 13- Campanale C, Massarelli C, Savino I, Locaputo V, Uricchio VF. A detailed review study on potential effects of microplastics and additives of concern on human health. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(4):1212.
- 14- Khan FR, Catarino AI, Clark NJ. The ecotoxicological consequences of microplastics and co-contaminants in aquatic organisms: a mini-review. *Emerg Top Life Sci.* 2022;6(4):339–48.
- 15- Hahladakis JN, Velis CA, Weber R, Iacovidou E, Purnell P. An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *J Hazard Mater.* 2018;344:179–99.

- 16- Khan FR, Patsiou D, Catarino AI. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics. En: Handbook of Microplastics in the Environment. Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 1–40.
- 17- Smith M, Love DC, Rochman CM, Neff RA. Microplastics in seafood and the implications for human health. *Curr Environ Health Rep.* 2018;5(3):375–86.
- 18- Velez JFM, Shashoua Y, Syberg K, Khan FR. Considerations on the use of equilibrium models for the characterisation of HOC-microplastic interactions in vector studies. *Chemosphere.* 2018;210:359–65.
- 19- Koelmans AA, Diepens NJ, Mohamed Nor NH. Weight of evidence for the microplastic vector effect in the context of chemical risk assessment. En: *Microplastic in the Environment: Pattern and Process.* Cham: Springer International Publishing; 2022. p. 155–97.
- 20- Sánchez A, Rodríguez-Viso P, Domene A, Orozco H, Vélez D, Devesa V. Dietary microplastics: Occurrence, exposure and health implications. *Environ Res.* 2022;212(113150):113150.
- 21- Cverenkárová K, Valachovičová M, Mackuľák T, Žemlička L, Bírošová L. Microplastics in the food chain. *Life (Basel).* 2021;11(12):1349.
- 22- Rillig MC. Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil? *Environ Sci Technol.* 2012;46(12):6453–4.
- 23- Osman AI, Hosny M, Eltaweil AS, Omar S, Elgarahy AM, Farghali M, et al. Microplastic sources, formation, toxicity and remediation: a review. *Environ Chem Lett.* 2023;21(4):2129–69.
- 24- Yang Z, Lü F, Zhang H, Wang W, Shao L, Ye J, et al. Is incineration the terminator of plastics and microplastics? *J Hazard Mater.* 2021;401(123429):123429.
- 25- Guerranti C, Martellini T, Perra G, Scopetani C, Cincinelli A. Microplastics in cosmetics: Environmental issues and needs for global bans. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2019;68:75–9.
- 26- Richardson K, Hardesty BD, Vince J, Wilcox C. Global estimates of fishing gear lost to the ocean each year. *Sci Adv.* 2022;8(41).
- 27- Calero M, Godoy V, Quesada L, Martín-Lara MÁ. Green strategies for microplastics reduction. *Curr Opin Green Sustain Chem.* 2021;28(100442):100442.
- 28- Prata JC. Airborne microplastics: Consequences to human health? *Environ Pollut.* 2018;234:115–26.
- 29- Bradney L, Wijesekara H, Palansooriya KN, Obadamudalige N, Bolan NS, Ok YS, et al. Particulate plastics as a vector for toxic trace-element uptake by aquatic and terrestrial organisms and human health risk. *Environ Int.* 2019;131(104937):104937.
- 30- Karami A, Golieskardi A, Choo CK, Larat V, Karbalaee S, Salamatinia B. Microplastic and mesoplastic contamination in canned sardines and sprats. *Sci Total Environ.* 2018;612:1380–6.

- 31- Dissanayake PD, Kim S, Sarkar B, Oleszczuk P, Sang MK, Haque MN, et al. Effects of microplastics on the terrestrial environment: A critical review. *Environ Res.* 2022;209(112734):112734.
- 32- Edo C, González-Pleiter M, Leganés F, Fernández-Piñas F, Rosal R. Fate of microplastics in wastewater treatment plants and their environmental dispersion with effluent and sludge. *Environ Pollut.* 2020;259(113837):113837.
- 33- Marsden, P., et al. *Microplastics in drinking water.* World Health Organization, 2019.
- 34- Tong H, Jiang Q, Hu X, Zhong X. Occurrence and identification of microplastics in tap water from China. *Chemosphere.* 2020;252(126493):126493.
- 35- Schymanski D, Goldbeck C, Humpf H-U, Fürst P. Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: Release of plastic particles from different packaging into mineral water. *Water Res.* 2018;129:154–62.
- 36- Kirstein IV, Gomiero A, Vollertsen J. Microplastic pollution in drinking water. *Curr Opin Toxicol.* 2021;28:70–5.
- 37- Kannan K, Vimalkumar K. A review of human exposure to microplastics and insights into microplastics as obesogens. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12.
- 38- Yong C, Valiyaveetil S, Tang B. Toxicity of microplastics and nanoplastics in mammalian systems. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(5):1509.
- 39- Fournier E, Leveque M, Ruiz P, Ratel J, Durif C, Chalancon S, et al. Microplastics: What happens in the human digestive tract? First evidences in adults using in vitro gut models. *J Hazard Mater.* 2023;442(130010):130010.
- 40- Tamargo A, Molinero N, Reinos JJ, Alcolea-Rodriguez V, Portela R, Bañares MA, et al. PET microplastics affect human gut microbiota communities during simulated gastrointestinal digestion, first evidence of plausible polymer biodegradation during human digestion. *Sci Rep.* 2022;12(1):1–15.
- 41- Stapleton P. Toxicological considerations of nano-sized plastics. *AIMS Environ. Sci.* 2019;6:367–378.
- 42- Amato-Lourenço, L. F., Carvalho-Oliveira, R., Júnior, G. R., dos Santos Galvão, L., Ando, R. A., & Mauad, T. (2021). Presence of airborne microplastics in human lung tissue. *Journal of Hazardous Materials*, 416(126124), 126124.
- 43- Ramsperger, Anja F. R. M., Bergamaschi E., et al. Nano- and microplastics: a comprehensive review on their exposure routes, translocation, and fate in humans. *NanoImpact.* 2023;29(100441), 100441.
- 44- Schirinzi, Gabriella F., et al. Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environmental Research* 159 (2017): 579-587.

- 45- Sangkham S, Faikhaw O, Munkong N, Sakunkoo P, Arunlertaree C, Chavali M, et al. A review on microplastics and nanoplastics in the environment: Their occurrence, exposure routes, toxic studies, and potential effects on human health. *Mar Pollut Bull.* 2022;181(113832):113832.
- 46- Barceló D, Picó Y, Alfarhan AH. Microplastics: Detection in human samples, cell line studies, and health impacts. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2023;101(104204):104204.
- 47- Shiwakoti S, Ko JY, Gong D, Dhakal B, Lee JH, Adhikari R, Gwak Y, Park SH, Jun Choi I, Schini-Kerth VB, Kang KW, Oak MH. Effects of polystyrene nanoplastics on endothelium senescence and its underlying mechanism. *Environ Int.* 2022;164:107248.
- 48- Zhu X, Wang C, Duan X, Liang B, Genbo Xu E, Huang Z. Micro- and nanoplastics: A new cardiovascular risk factor? *Environ Int.* 2023;171(107662):107662.
- 49- Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. Who.int. [citado el 19 de febrero de 2024]. Disponible en: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- 50- Lobos Bejarano JM, Brotons Cuixart C. Factores de riesgo cardiovascular y atención primaria: evaluación e intervención. *Aten Primaria.* 2011;43(12):668–77.
- 51- Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013;9(10):1057–69.
- 52- Bernard I, Limonta D, Mahal L, Hobman T. Endothelium infection and dysregulation by SARS-CoV-2: Evidence and caveats in COVID-19. *Viruses.* 2020;13(1):29.
- 53- Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress. *Annu Rev Biochem.* 2017;86(1):715–48.
- 54- Sahoo A, Tiwari S. Antioxidants and antioxidative enzymes as potential biomarkers for assessing stress in plants. *Int J Plant Environ.* 2022;8(02):95–105.
- 55- MTT assay protocol for cell viability and proliferation. Sigmaaldrich.com. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>
- 56- Basini G, Grolli S, Bertini S, Bussolati S, Berni M, Berni P, et al. Nanoplastics induced oxidative stress and VEGF production in aortic endothelial cells. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2023;104(104294):104294.
- 57- FUTURE BRIEF: Nanoplastics: state of knowledge and environmental and human health impacts – Issue 27. Environment. Disponible en: [https://environment.ec.europa.eu/publications/future-brief-nanoplastics-state-knowledge-and-environmental-and-human-health-impacts-issue-27\\_en](https://environment.ec.europa.eu/publications/future-brief-nanoplastics-state-knowledge-and-environmental-and-human-health-impacts-issue-27_en)
- 58- Lu Y-Y, Li H, Ren H, Zhang X, Huang F, Zhang D, et al. Size-dependent effects of polystyrene nanoplastics on autophagy response in human umbilical vein endothelial cells. *J Hazard Mater.* 2022;421(126770):126770.
- 59- Lomonaco T, Persiani E, Biagini D, Gisone I, Ceccherini E, Cecchetti A, et al. Virgin and aged Microplastics induce type-specific inflammatory responses on vascular cells. *Research Square.* 2023.

- 60- Płuciennik K, Sicińska P, Misztal W, Bukowska B. Important factors affecting induction of cell death, oxidative stress and DNA damage by nano- and microplastic particles in vitro. *Cells*. 2024;13(9):768.
- 61- Lu Y-Y, Cao M, Tian M, Huang Q. Internalization and cytotoxicity of polystyrene microplastics in human umbilical vein endothelial cells. *J Appl Toxicol*. 2023;43(2):262–71.
- 62- Fu Y, Fan M, Xu L, Wang H, Hu Q, Jin Y. Amino-functionalized polystyrene nano-plastics induce mitochondria damage in human umbilical vein endothelial cells. *Toxics*. 2022;10(5):215.