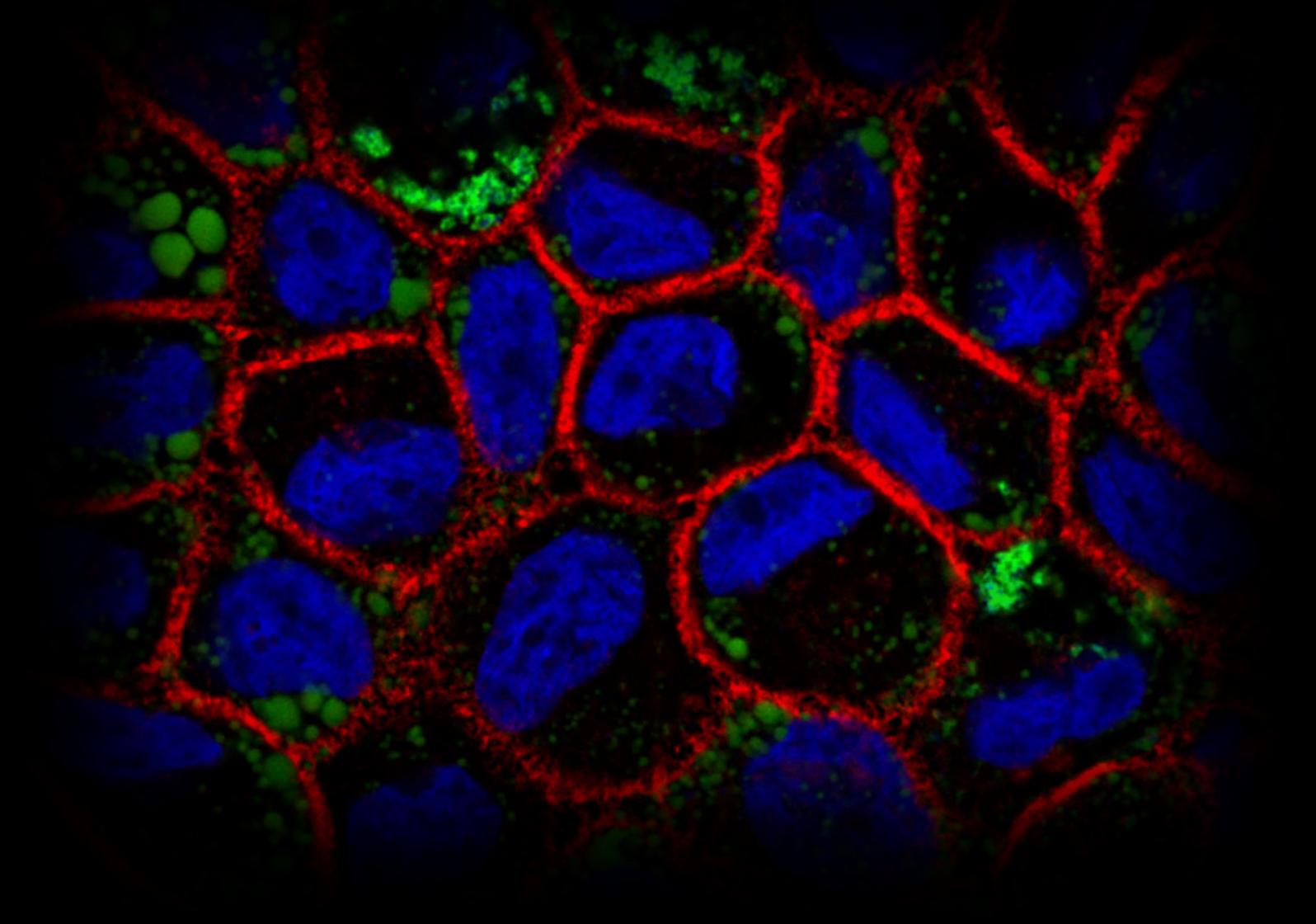


TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DEL IMPACTO
TOXICOLÓGICO DEL RETARDANTE
DE LLAMA TBBPA ASOCIADO A
PARTÍCULAS NANOPLÁSTICAS EN
MODELOS CELULARES *IN VITRO***

Patricia Soto Bielicka



TESIS DOCTORAL

Evaluación del impacto toxicológico del retardante de llama TBBPA asociado a partículas nanoplásticas en modelos celulares *in vitro*.

Memoria presentada por **Patricia Soto Bielicka** para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid en el Programa de Doctorado en Biología.

Trabajo dirigido por las Dras.,

Paloma Fernández Freire

M^a José Hazen de San Juan

Dpto. Biología, Universidad Autónoma de Madrid

2023

Esta tesis se ha llevado a cabo con la financiación del proyecto: “Uso de modelos celulares de peces y humanos para evaluar el impacto toxicológico de nano/microplásticos como vehículos de retardadores de llama. (INTERTOX)” (RT2018-096046-B-C22) subvencionado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Patricia Soto Bielicka ha disfrutado de un contrato de Ayudante de Investigación de la Conserjería de Educación e Investigación de la Comunidad de Madrid y el Fondo Social Europeo.

“Aunque todo es locura, no deja de observar método en lo que dice.”

Hamlet, 1603.

William Shakespeare

Agradecimientos

Después de haber tenido que pasar por varias desventuras a lo largo del camino, por fin ha llegado ese momento en el que puedo escribir estas páginas, que espero que sean breves pero concisas, y que tanto tiempo han permanecido esperando al momento de ver la luz. Dicen que “todo lo bueno se hace esperar” y, aunque muchas veces queramos que las cosas sean más fáciles, la verdad es que, si la vida fuera sencilla, ni aprenderíamos nada de ella ni valoraríamos lo que nos brinda. De vez en cuando viene bien que decida ponernos a prueba, porque sólo entonces somos capaces de ver de lo que somos capaces de llevar a cabo, así como de resistir. Además, por suerte o por desgracia, me gusta llevar la contraria, especialmente a mí misma.

Como todas las cosas que merecen la pena, esto no habría sido posible de no ser por un puñado de gente que ha estado conmigo durante todo el camino brindándome su apoyo, escuchándome y ofreciéndome diferentes puntos de vista. Porque, seamos sinceros, todos necesitamos saber que tenemos gente que está dispuesta a ayudarnos y a estar ahí cuando lo precisamos. Y qué menos que reconocer ese apoyo como se merece, aunque probablemente en muchas ocasiones las palabras se quedan cortas. Aun así, intentaré que plasmen lo mejor posible lo que pretendo expresaros.

En primer lugar, a las Dras. Paloma Fernández Freire y M^a José Hazen de San Juan. GRACIAS. Podría ponerlo más grande, subrayarlo, con signos de exclamación... Pero jamás podría expresar todo el agradecimiento que siento por haberme dado la oportunidad de haber podido hacer esta Tesis. Gracias por haber confiado en mí y por darme los consejos y la ayuda necesaria para poder sacarla adelante. Sé que esto es lo que se suele decir, pero lo digo de forma total y absolutamente sincera. Si no hubiera sido por vosotras, quien sabe dónde, cuándo, y cómo hubiera hecho el doctorado. Si es que hubiese llegado a hacerlo. Así que no puedo más que reiterar mi agradecimiento, y seguiría sin poder expresar completamente lo que siento. Espero haber estado a la altura y no haber sido cargante, o al menos no demasiado.

A ti también Ana porque, aunque nos conocimos en medio de la pandemia y la mascarilla no ayudaba mucho con la comunicación no verbal (reconozcámoslo, la mascarilla me tapaba toda la parte expresiva de la cara), lo paliamos un poco con el *post-it* sonrisa encima de ella. Gracias por ayudarme, enseñarme, por contarme batallitas y hacerme reír. Seremos unas cenizas, pero de ahí es de donde resurge el Ave Fénix.

También quiero dar las gracias al Dpto. de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid por haberme acogido y echado un cable en alguna que otra ocasión. Gracias a ti también Sole, por tu ayuda con las cuestiones y gestiones más genéticas de esta Tesis, y a Conchi por alguna que otra charla (y café). A Lola, del Laboratorio de Microscopía Confocal (SIdi) de la UAM, por enseñarme el manejo del confocal y las charlas que hemos compartido durante las horas en las que he pasado mirando muestras. Ciertamente, las cosas que no podemos cambiar en la vida difícilmente las podemos solucionar, pero lo que sí que podemos cambiar es la manera y la forma en la que nos tomamos y afectan las cosas.

Por otro lado, gracias al Dr. José F. de Celis del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) por su ayuda con el confocal del centro, ya que si no, las imágenes que aparecen en este trabajo no habrían encontrado su lugar entre estas páginas. También gracias al servicio de Microscopía Electrónica del CBMSO, por su profesionalidad y buen hacer.

Como al fin y al cabo, en la vida o bien nos encontramos con otras personas, o somos nosotros los que aparecemos de repente en la vida de otros, también toca agradecerles el estar ahí. Y esas personas no iban a ser menos importantes, especialmente porque sin algunas de ellas, todo hubiera sido radicalmente diferente.

Agradecimientos

Michel, no sé muy bien qué decirte que no sepas ya, pero eres una de las personas que más ha marcado mi vida desde que nos conocimos en segundo de carrera. Gracias por escucharme siempre, tanto mis rayadas mentales, como mis idas de olla, mis tonterías y mis no tan tonterías. Por las charlas filosófico-existenciales que tenemos, y por darme consejos y puntos de vista que, aunque sabes que al final las decisiones que tomo las hago en función de lo que considero que es lo correcto y asumo hasta las últimas consecuencias, siempre tengo en cuenta lo que me dices. Seguro que acabas encontrando algo que te motive de verdad y (esperemos) que sea estable o al menos dure bastante tiempo. María, chica, yo no sé qué es lo que ves en mí ni por qué, porque ya sabes que yo siempre lo veo exactamente de la forma contraria, aunque admito que nunca soy imparcial ni objetiva conmigo misma, pero igualmente, que sigo sin verlo. Aun así, tú también siempre me ofreces el apoyo y el oído que necesito cuando lo único que hago es verlo todo negro. Y aunque debo de tenerte comido el tarro igual que a Michel con mis necesidades, siempre estás ahí. Espero que te saques las opos, que seguro que lo haces, sea más tarde o más temprano. Al resto de biolocos, Ana, Adrián, José y Clara, que compartimos buenos momentos en la carrera y fuera de ella, gracias también. Carol, qué ironía que viendo cómo nos llevábamos desde pequeñas, sin embargo, hasta el día de hoy seguimos en contacto.

También quiero agradecerse a muchas otras personas con las que he compartido muchos otros momentos de mi vida, y que, aunque hayamos seguido caminos diferentes, siempre me quedaré con las buenas experiencias que vivimos, aunque ahora no sea posible por unas u otras razones. Como sé que me acabaré dejando a alguien fuera del tintero, prefiero dejar esto de forma ambigua para no excluir a nadie, pero gracias a todas esas personas por haberme enseñado cosas que o bien desconocía, o que definitivamente sé que no debería hacer en absoluto, puesto que esas lecciones probablemente son las más importantes.

Y, por último, muchas gracias a mi familia, la cual de unas formas u otras, ha estado respaldándome. A mi madre, que aunque discutimos más de la cuenta, sé que siempre intentas hacer lo que consideras que es lo mejor para mí y has sacrificado muchas cosas para ello. Que sepas que estoy muy orgullosa de ti. A mi hermana, que aunque te rayas más de la cuenta (viene de familia, me temo) y a veces eres un poco dramas, sé que te preocupas por mí. A José, por cuidar de mi hermana a pesar de todas las vicisitudes. A mi sobrino Hugo, que aunque sea un tostón, sigue estudiando porque es lo mejor para ti. A mis tías Marisol y Gloria que estáis ahí apoyándome y ayudándome como buenamente podéis. A mi tía Antoñita, que aunque las distancias nos separan, sé que siempre piensa en mí. A mi tía Ula, que siempre que voy a Polonia, me recibe con los brazos abiertos. Para finalizar, gracias a mis tíos Antonio y Consuelo, porque aunque no tengamos una relación tan estrecha, sé que están ahí.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	7
Evaluación de sustancias tóxicas. El proyecto REACH.....	11
El principio de las tres Rs.....	12
Métodos alternativos	13
Modelos <i>in vitro</i> en toxicología.....	15
Líneas celulares	17
1. <i>Líneas celulares de peces (Oncorhynchus mykiss)</i>	17
2. <i>Líneas celulares humanas (Homo sapiens)</i>	19
Criterios generales sobre el diseño de experimentos en toxicología	20
Contaminantes emergentes	23
Mezclas de contaminantes	25
Retardantes de llama bromados (BFRs)	26
Plásticos	30
HIPÓTESIS	37
OBJETIVOS	37
MATERIAL Y MÉTODOS	39
1. Compuestos de estudio.....	41
2. Líneas celulares.....	42
3. Diseño experimental.....	43
4. Ensayos de citotoxicidad	46
5. Evaluación del estrés oxidativo	48
6. Determinación del potencial de la membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi$).....	49
7. Interferencia del TBBPA y los PSNPs.....	49
8. Evaluación de la genotoxicidad: ensayo Cometa.....	50
9. Evaluación de los cambios en la expresión génica: Real-Time qRT-PCR.....	51
10. Morfología celular de células intestinales diferenciadas	53
11. Análisis estadístico.....	54

RESULTADOS	57
Parte 1. Evaluación de la toxicidad aguda sobre líneas celulares de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	59
1.1. <i>Estudio de la citotoxicidad basal</i>	59
1.2. <i>Ensayos de toxicidad específica</i>	65
Parte 2. Evaluación de la toxicidad aguda sobre células intestinales humanas.....	67
2.1. <i>Estudio de la citotoxicidad basal</i>	67
2.2. <i>Ensayos de toxicidad específica</i>	76
Parte 3. Evaluación de la toxicidad del TBBPA y los PSNPs sobre sistemas celulares fisiológicamente relevantes.....	79
3.1. <i>Estudio de la citotoxicidad basal</i>	79
3.2. <i>Ensayos de toxicidad específica</i>	84
3.3. <i>Evaluación morfológica de las células intestinales diferenciadas</i>	87
DISCUSIÓN	93
La presencia de los PSNPs en las mezclas influye ligeramente en la toxicidad del TBBPA....	98
Las combinaciones TBBPA-PSNPs modifican las rutas de estrés celular.....	102
La incorporación intracelular de los PSNPs modifica el comportamiento del TBBPA en los modelos experimentales de relevancia fisiológica.....	110
CONCLUSIONES	119
BIBLIOGRAFÍA	123
ANEXO	151

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Muertes estimadas atribuidas a la contaminación (en millones) por tipo de contaminación y sexo, 2019.....	9
TABLA 2. Principales características de las líneas celulares de peces empleadas	18
TABLA 3. Principales características de las líneas celulares humanas empleadas	20
TABLA 4. Características fisicoquímicas del compuesto de estudio TBBPA	41
TABLA 5. Cebadores utilizados para la evaluación mediante Real-Time qRT-PCR	51
TABLA 6. Valores de relevancia toxicológica para el TBBPA (μM) en las líneas celulares de peces	60
TABLA 7. Distribución del tamaño de los PSNPs en medio de cultivo L-15	61
TABLA 8. Valores de relevancia toxicológica para los PSNPs en la línea celular RTgill-W1	62
TABLA 9. Valores de BDR de la combinación TBBPA-PSNPs en la línea celular RTgill-W1 tras 24 h de exposición	64
TABLA 10. Dosis de referencia (BMD) de la citotoxicidad basal del TBBPA tras 24 h de exposición en las líneas celulares evaluadas	68
TABLA 11. Distribución del tamaño de los PSNPs en las condiciones experimentales empleadas en las líneas celulares humanas	69
TABLA 12. Dosis de referencia (BMD) de la combinación TBBPA-PSNPs en la línea celular Caco-2 tras 24 h de exposición	73
TABLA 13. Dosis de referencia (BMD) de la combinación TBBPA-PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX tras 24 h de exposición	75
TABLA 14. Dosis de referencia (BMD) del TBBPA en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX tras 21 d de exposición	80
TABLA 15. Dosis de referencia (BMD) de la combinación TBBPA-PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX tras 21 d de exposición	83

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Representación esquemática de los AOPs.....	14
FIGURA 2. Derivación de diferentes tipos de células humanas.....	17
FIGURA 3. Clasificación de los contaminantes emergentes.....	24
FIGURA 4. Principales rutas de entrada de los contaminantes emergentes en el medio ambiente ..	25
FIGURA 5. Representación esquemática de las fuentes y rutas de los BFRs	28
FIGURA 6. Principales fuentes y rutas de exposición del tetrabromobisfenol A (TBBPA).....	30
FIGURA 7. Principales fuentes de nanoplasticos en el medio ambiente	33
FIGURA 8. Criterios esenciales durante la planificación experimental.....	44
FIGURA 9. Diseño experimental para la determinación de la toxicidad aguda	45
FIGURA 10. Diseño experimental para la determinación de la toxicidad por exposición prolongada	46
FIGURA 11. Citotoxicidad del TBBPA sobre las líneas celulares de peces. Evaluación de la actividad metabólica (AB) y de la membrana plasmática (CFDA-AM) en las líneas celulares RTgill-W1, RTL-W1 y RTgutGC tras 24 h de exposición.....	59
FIGURA 12. Caracterización de los PSNPs en MET bajo las condiciones experimentales planteadas	61
FIGURA 13. Citotoxicidad de los PSNPs en la línea celular RTgill-W1. Evaluación del AB y de la CFDA-AM en la línea celular RTgill-W1 tras 24 h	62
FIGURA 14. Citotoxicidad de la combinación del TBBPA y los PSNPs en la línea celular RTgill-W1. Evaluación del AB y de la CFDA-AM en la línea celular RTgill-W1 tras 24 h de exposición	63
FIGURA 15. Curva dosis-respuesta TBBPA-PSNPs en la línea celular RTgill-W1.....	64
FIGURA 16. Efectos de la combinación TBBPA-PSNPs sobre el metabolismo oxidativo	65
FIGURA 17. Genotoxicidad del TBBPA, los PSNPs y sus combinaciones en la línea celular RTgill-W1	66
FIGURA 18. Citotoxicidad del TBBPA en las líneas celulares Caco-2, HT29-MTX y el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Evaluación del AB, CFDA-AM y RN tras 24 h de exposición.....	67
FIGURA 19. Caracterización de los PSNPs en MET bajo las condiciones experimentales planteadas	70
FIGURA 20. Citotoxicidad de los PSNPs en la línea celular Caco-2. Evaluación del AB, CFDA-AM y RN en la línea Caco-2 tras 24 h de exposición a los PSNPs.....	70
FIGURA 21. Citotoxicidad de los PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Evaluación del AB, CFDA-AM y RN en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX tras 24 h de exposición a los PSNPs	71
FIGURA 22. Citotoxicidad de la combinación del TBBPA y los PSNPs en la línea celular Caco-2. Evaluación del AB, CFDA-AM y RN en la línea celular Caco-2 tras 24 h de exposición a las diferentes combinaciones de TBBPA-PSNPs.....	72
FIGURA 23. Curva dosis-respuesta TBBPA-PSNPs en la línea celular Caco-2	73
FIGURA 24. Citotoxicidad de la combinación del TBBPA y los PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Evaluación del AB, CFDA-AM y RN en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX tras 24 h de exposición a las diferentes combinaciones de TBBPA-PSNPs	74
FIGURA 25. Curva dosis-respuesta TBBPA-PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX	75

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 26. Efectos de la combinación TBBPA-PSNPs sobre el metabolismo oxidativo del co-cultivo Caco-2/HT29-MTX.....	77
FIGURA 27. Cambios en la expresión de genes de estrés oxidativo en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX	77
FIGURA 28. Genotoxicidad de la combinación TBBPA-PSNPs, así como por separado, en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Resultados del ensayo Cometa mostrando el % de ADN en la cola tanto en el procedimiento alcalino (A) como en la modificación con la enzima FPG (B), tras la exposición durante 24 h	78
FIGURA 29. Evaluación de los cambios en la expresión génica mediante Real-Time qRT-PCR en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Resultados mostrando la expresión relativa (RQ) de las diferentes combinaciones de TBBPA-PSNPs, así como por separado, al evaluar diferentes genes relacionados con reparación del daño al ADN durante 24 h.....	79
FIGURA 30. Citotoxicidad del TBBPA en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Evaluación del AB y la CFDA-AM tras 21 d de exposición.....	80
FIGURA 31. Citotoxicidad de los PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Evaluación del AB y la CFDA-AM tras 21 d de exposición	81
FIGURA 32. Citotoxicidad de la combinación del TBBPA y los PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Evaluación del AB y la CFDA-AM tras 21 d de exposición.....	82
FIGURA 33. Curva dosis-respuesta TBBPA-PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX	83
FIGURA 34. Evaluación de los cambios en la expresión génica mediante Real-Time qRT-PCR en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Resultados mostrando la expresión relativa (RQ) de las diferentes combinaciones de TBBPA-PSNPs, así como por separado, al evaluar diferentes genes relacionados con procesos de estrés oxidativo tras su exposición prolongada durante 21 d	84
FIGURA 35. Genotoxicidad de las combinaciones y tratamientos individuales de TBBPA y PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Resultados del ensayo Cometa mostrando el % de ADN en la cola tanto en el procedimiento alcalino (A) como en la modificación con la enzima FPG (B), tras la exposición durante 21 d.....	85
FIGURA 36. Evaluación de los cambios en la expresión génica mediante Real-Time qRT-PCR en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Resultados mostrando la expresión relativa (RQ) de las diferentes combinaciones de TBBPA-PSNPs, así como por separado, al evaluar diferentes genes relacionados con daño al ADN tras su exposición durante 21 d	86
FIGURA 37. Evaluación de los cambios en la expresión génica mediante Real-Time qRT-PCR en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Resultados mostrando la expresión relativa (RQ) de las diferentes combinaciones de TBBPA-PSNPs, así como por separado, al evaluar diferentes genes presentes en células diferenciadas tras su exposición durante 21 d.....	87
FIGURA 38. Evaluación morfológica de las Caco-2 diferenciadas mediante microscopía confocal....	88
FIGURA 39. Evaluación morfológica de las Caco-2 diferenciadas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).....	89
FIGURA 40. Localización intracelular de los PSNPs en las células Caco-2 (MET)	91

ABREVIATURAS

AB. Alamar blue

ABCB1. Transportador dependiente de ATP, subfamilia B miembro 1.

ABS. Acrilonitrilo-butadieno-estireno

ADN. Ácido desoxirribonucleico

ALPI. Fosfatasa alcalina intestinal

AOPs. *Adverse Outcome Pathways*

ARN. Ácido ribonucleico

ATCC. *American Type Culture Collection*

ATM. Ataxia telangiectasia mutada

ATR. Proteína relacionada con ataxia telangiectasia y Rad3

BDRs. *Benchmark Dose Responses*

BER. Reparación por escisión de bases

BFRs. Retardantes de llama bromados

BMDs. *Benchmark Doses*

BSA. Albúmina de suero bovino

CE. Comisión Europea

CED. Dosis crítica efectiva

CEs. Contaminantes Emergentes

CF. Carboxifluoresceína

CFDA-AM. Carboxifluoresceína diacetato acetoximetil ester

COPs. Contaminantes Orgánicos Persistentes

CPEs. Contaminantes de Preocupación Emergente

CTAs. *Cell Transformation Assays*

DCF. Diclorofluoresceína

DLS. *Dynamic light scattering*

DMEM. Medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO. Dimetil sulfóxido

DSBs. Roturas de hebra doble

EC₅₀. Concentración que produce un efecto en el 50% de la población

ECHA. Agencia Europea de Sustancias Químicas

ECVAM. Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos

EE. UU. Estados Unidos

ELS. Dispersión de luz electroforética

EMI. Evento molecular iniciador

ERAD. Degradación de proteínas asociada al RE

FPG. Formamidopirimidina ADN glicosilasa

FRs. Retardantes de llama

GSTP1. Glutación S-transferasa pi 1

H₂DCFDA. Diclorofluoresceína diacetato

HBCDDs. Hexabromociclododecanos

HDPE. Polietileno de alta densidad

HTS. *High-Throughput Screening*

ICH. Conferencia Internacional en Harmonización

LDPE. Polietileno de baja densidad

MET. Microscopía electrónica de transmisión

MMR. Reparación de errores de emparejamiento

MPs. Microplásticos

NADH. Nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH. Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NAMs. Metodologías de abordaje no animales

ABREVIATURAS

NER. Reparación por escisión de nucleótidos

NHEJ. Reparación de extremos no homólogos

NORMAN. *Network of reference laboratories, research centres and related organisations for monitoring of emerging environmental substances*

NPs. Nanoplásticos

NRF2. Factor nuclear eritroide similar al factor 2

OECD. *Organisation for Economic Co-operation and Development*

OGG1. 8-oxoguanina ADN glicosilasa 1

PARP1. Poli-(ADP Ribosa) Polimerasa 1

PBBs. Polibromobifenilos

PBDEs. Polibromodifenil éteres

PBS. Tampón fosfato salino

PC. Policarbonato

PE. Polietileno

PET. Tereftalato de polietileno

PFA. Paraformaldehído

PFCPs. Productos Farmacéuticos y de Cuidado Personal

PFCs. Compuestos perfluorados

PP. Polipropileno

PPEs. Partículas de Preocupación Emergente

PS. Poliestireno

PSMPs. Micropartículas/microplásticos de poliestireno

PSNPs. Nanopartículas/nanoplásticos de poliestireno

PUR. Poliuretano

PVC. Policloruro de vinilo

QPEs. Químicos de Preocupación Emergente

RE. Retículo endoplásmico

REACH. *Registration, Evaluation, Authorisation, and restriction of Chemicals*

RN. Rojo neutro

ROS. Especies reactivas de oxígeno

RPF. Factor de potencia relativa

RSCs. Respuestas al estrés celular

Real-Time qRT-PCR. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa en tiempo real

SOD2. Superóxido dismutasa 2

SSBs. Roturas de hebra única

TBBPA. 3,3',5,5'-Tetrabromobisfenol A

TJP1. Proteína de uniones estrechas/ocluyentes 1

TJs. Uniones estrechas

TMRM. Tetrametilrodamina metil éster

TSAR. *Tracking System for Alternative methods towards Regulatory acceptance*

UE. Unión Europea

UPR. Respuesta frente a proteínas mal plegadas

UV. Radiación ultravioleta

ZO-1. *Zonula occludens 1*



RESUMEN



La contaminación ambiental implica la presencia en nuestro entorno de agentes externos, tanto químicos como biológicos, que repercuten negativamente en la salud humana. Unas de las sustancias que más preocupación están suscitando actualmente son los denominados contaminantes emergentes. Estos corresponden a un grupo de sustancias de diferentes orígenes que no son monitorizadas normalmente, lo que hace que sean capaces de ingresar en el medio ambiente y causar efectos adversos en la salud humana. Aunque se suelen evaluar los compuestos tóxicos por separado, la realidad es que nos vemos expuestos diariamente a mezclas complejas de sustancias químicas presentes en nuestro entorno. Esto hace que sea acuciante la necesidad de evaluar sus efectos en mezclas. Sin embargo, el número de posibles combinaciones de compuestos químicos es enorme, lo que implica que no sea realista ni posible el estudiarlas todas. Por ello, deben desarrollarse estrategias adecuadas que permitan discernir los efectos que tienen los compuestos en dichas mezclas, siendo imprescindible conocer previamente los ejercidos por los compuestos por separado. Entre los diferentes métodos alternativos disponibles, los modelos *in vitro*, y especialmente aquellos basados en el uso de células, reflejan nuestra actual comprensión mecanicista de los efectos de los compuestos químicos sobre la salud ambiental y humana, contando además con numerosas ventajas.

En el presente estudio se han determinado los efectos producidos por la mezcla de tetrabromobisfenol A (TBBPA), un retardante de llama bromado de uso común e importante producción en el mercado, que se encuentra en todo tipo de productos de consumo electrónico, y los plásticos, sustancias compuestas por polímeros sintéticos, de presencia ubicua y cuyas características fisicoquímicas lo convierten en uno de los contaminantes que más preocupación genera actualmente. En concreto, se evaluó la influencia que tienen las nanopartículas de poliestireno (PSNPs), partículas de pequeño tamaño con la capacidad de actuar como vectores para multitud de sustancias químicas, sobre el TBBPA, y determinar si dichas mezclas ejercen efectos diferentes en comparación con los que presentan por separado. Se ha realizado esta evaluación empleando diferentes modelos celulares, que incluyen tanto líneas establecidas de peces (RTgillW1, RTgutGC y RTL-W1), como líneas intestinales humanas (Caco-2, HT29-MTX y su co-cultivo).

Las aproximaciones realizadas sobre los diferentes modelos de estudio muestran que tanto los modelos celulares de peces, como los de mamíferos, son complementarios entre sí. Ambos responden de forma similar a los efectos tóxicos ejercidos por los compuestos evaluados. La diferencia fundamental entre ellos es la mayor sensibilidad de las líneas de peces, especialmente en las RTgill-W1, en comparación con los modelos celulares intestinales. Se pudo determinar que los efectos citotóxicos ejercidos por el TBBPA son dependientes de la concentración, afectando a las células de forma general al evaluar la citotoxicidad basal. En el caso de los PSNPs, estos parecen ejercer efectos específicos en determinadas localizaciones celulares, como se ha visto al evaluar sus efectos sobre las Caco-2 y el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX, y no parecen ser tan dependientes de la concentración. Además, el co-cultivo se comporta de una forma única y característica al compararla con las líneas Caco-2 y HT29-MTX por separado, mostrando una mayor resistencia a los efectos citotóxicos ejercidos tanto por el TBBPA como por los PSNPs. La evaluación del co-cultivo tras la exposición prolongada a los compuestos, confirma su mayor resistencia a los efectos citotóxicos ejercidos por ambos, detectándose diferencias significativas únicamente en las concentraciones más elevadas de estudio. El estudio de las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs muestra que, a pesar de la existencia de combinaciones cuyos efectos resultan significativamente diferentes de los ejercidos por el TBBPA y los PSNPs de forma individual, no parecen seguir un patrón claro, ejerciendo un mayor efecto sobre la integridad de la membrana plasmática. Además, los efectos citotóxicos que ejercen son leves, y parece que se deben fundamentalmente al TBBPA, tanto en exposiciones agudas como en aquellas sostenidas durante los 21 días necesarios para la diferenciación de las Caco-2.



Por otro lado, las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs tampoco causan efectos significativos sobre la formación de ROS ni sobre el potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi$) en exposiciones agudas. Sin embargo, concentraciones elevadas de PSNPs provocan una hiperpolarización de las mitocondrias, lo cual sugiere que las combinaciones en las que esté presente esta condición acaben originando la despolarización mitocondrial a largo plazo y, por tanto, puedan llevar a las células a la activación de las vías de señalización de muerte celular. La evaluación de la genotoxicidad y el daño oxidativo al ADN muestra que las combinaciones TBBPA-PSNPs ejercen efectos significativos sobre esta molécula, provocando daños, tanto de forma directa como indirecta y son capaces de provocar la sobreexpresión de genes relacionados con el metabolismo oxidativo y la reparación del daño al ADN.

En cuanto a la evaluación de la expresión génica de los biomarcadores de diferenciación del co-cultivo Caco-2/HT29-MTX, las combinaciones TBBPA-PSNPs son capaces de alterar el ribete en cepillo característico de los enterocitos, así como la expresión de los genes relacionados con las uniones estrechas. En este último caso, las mezclas con elevadas concentraciones de PSNPs son determinantes. A nivel morfológico, se observa que las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs afectan a las vías encargadas de degradar y reciclar los componentes celulares, ya que se aprecian numerosos cuerpos multilamelares y lisosomas. Por otra parte, los PSNPs son capaces de internalizarse y acumularse rápidamente en las células Caco-2. Estas evaluaciones nos indican que las mezclas TBBPA-PSNPs ejercen efectos significativamente diferentes de los presentados por los compuestos por separado, y tienen una especial relevancia en condiciones fisiopatológicas, llegando a alterar la integridad de la barrera intestinal.



INTRODUCCIÓN



La contaminación ambiental implica la presencia en nuestro entorno de agentes externos químicos o biológicos que repercuten negativamente no solo en la salud humana sino en la de múltiples especies de animales y plantas que ven alterados sus hábitats. La contaminación del agua, aire y suelo está originada principalmente por la actividad humana y tiene su origen a partir de múltiples fuentes entre las que se incluyen las plantas eléctricas y automóviles que contaminan el aire exterior, los productos químicos de limpieza o el tabaquismo en el interior, las actividades mineras y las plantas de reciclaje, así como las aguas residuales, pesticidas y diversos productos químicos que contaminan tanto el aire como el suelo y el agua.

Actualmente se considera a la contaminación ambiental como la mayor causa de enfermedad y muerte, más que por enfermedades como el VIH/SIDA, malaria, con menos de 1 millón de muertes al año (WHO, 2022a, b) y tuberculosis, con alrededor de 1,4 millones en el mundo (WHO, 2022c). Se estima que más de 9 millones de personas mueren cada año por enfermedades causadas por la contaminación en todo el mundo (Landrigan & Fuller, 2015), estando el 92% de estas muertes localizadas en los países en vías de desarrollo y subdesarrollados (Fuller *et al.*, 2022).

A partir del año 2000, el rápido descenso en el número de muertes causadas por la contaminación en interiores, la ingesta de agua insalubre y el saneamiento inadecuado se ha visto compensado por el aumento en el número de muertes atribuidas a formas más modernas de contaminación: la contaminación medioambiental, el envenenamiento por plomo (saturnismo) y la contaminación causada por exposición a agentes tóxicos en el ambiente laboral, las cuales requieren de un mayor esfuerzo para su mitigación y prevención. Sólo los riesgos asociados con la toxicología ocupacional fueron responsables de 870.000 muertes, mientras que el saturnismo fue el responsable de 900.000 muertes prematuras en 2019 (Fuller *et al.*, 2022), tal y como puede verse en la Tabla 1.

Además, los efectos de la contaminación sobre la salud varían en función del sexo. Los hombres son más propensos a morir por la exposición a contaminantes ambientales, intoxicación por plomo y por la exposición ocupacional de agentes tóxicos; mientras que las mujeres y los niños son más propensos a morir por la exposición a agentes contaminantes presentes en el agua que los hombres (Fuller *et al.*, 2022).

TABLA 1. Muertes estimadas atribuidas a la contaminación (en millones) por tipo de contaminación y sexo, 2019. Modificado de Fuller *et al.* (2022).

	Mujeres	Hombres	Total
Contaminación ambiental total*	2,92 (2,53–3,33)	3,75 (3,31–4,25)	6,67 (5,90–7,49)
En interiores†	1,13 (0,80–1,50)	1,18 (0,79–1,66)	2,31 (1,63–3,12)
Particulados ambientales‡§	1,70 (1,38–2,01)	2,44 (2,02–2,83)	4,14 (3,45–4,8)
Ozono‡	0,16 (0,07–0,25)	0,21 (0,09–0,33)	0,37 (0,17–0,56)
Contaminación hídrica total*	0,73 (0,40–1,26)	0,63 (0,46–0,95)	1,36 (0,96–1,96)
Desinfección inapropiada†	0,40 (0,23–0,68)	0,36 (0,26–0,54)	0,76 (0,54–1,09)



Fuentes insalubres†¶	0,66 (0,35–1,15)	0,57 (0,39–0,88)	1,23 (0,82–1,79)
Contaminación ocupacional total*	0,22 (0,17–0,28)	0,65 (0,54–0,79)	0,87 (0,74–1,02)
Carcinógenos‡	0,07 (0,05–0,09)	0,28 (0,22–0,35)	0,35 (0,28–0,42)
Particulados‡	0,15 (0,10–0,21)	0,37 (0,27–0,47)	0,52 (0,42–0,64)
Saturnismo*‡	0,35 (0,19–0,53)	0,56 (0,36–0,77)	0,90 (0,55–1,29)
Contaminación total moderna*	2,28 (1,86–2,67)	3,55 (3,08–4,04)	5,84 (5,03–6,61)
Contaminación total tradicional*	1,85 (1,39–2,42)	1,81 (1,36–2,38)	3,66 (2,82–4,63)
Contaminación total*	3,92 (3,39–4,47)	5,09 (4,57–5,68)	9,01 (8,12–10,0)

Los datos se expresan como N en millones (95% IC). *Sumatorio personalizado del “Institute for Health Metrics and Evaluation”, corregido por superposición: los totales para la contaminación ambiental, hídrica, moderna, tradicional y la total son menores que la media aritmética de los factores de riesgo individuales dentro de cada una de estas categorías porque sus contribuciones se superponen (p. ej. La contaminación en interiores y la contaminación ambiental pueden contribuir al desarrollo de las mismas enfermedades). †Factor de riesgo de contaminación tradicional. ‡Factor de riesgo de contaminación moderna. §Partículas ambientales finas (PM_{2,5}). ¶Exposición ocupacional a material particulado respirable, torácico o inhalable.

Los efectos de la contaminación sobre la salud humana poseen una gran relevancia y serían aún mayores si se tuviera un conocimiento más profundo acerca de las rutas que siguen los compuestos químicos en el medio ambiente. Esta clase de investigación puede llegar a ser problemática, puesto que las personas nos encontramos expuestas a cientos de agentes tóxicos que pueden tener su origen tanto de fuentes naturales como antropogénicas: sus interacciones, tanto físicas como químicas, determinan una serie de fenómenos sumamente complejos que deben tenerse especialmente en cuenta. Algunos compuestos químicos se encuentran ampliamente distribuidos a escala global, mientras que otros sólo lo hacen en torno a zonas con presencia de actividad industrial u otras zonas específicas; en estos casos, su concentración es notablemente superior a la que se encuentra de forma estándar en dichas zonas. Diferentes estudios han tratado de hallar la correlación existente entre los contaminantes presentes en el agua y el suelo y sus efectos sobre la salud humana, empleando para ello diferentes metodologías (Lillini *et al.*, 2021).

La actividad industrial responsable de la contaminación, localizada en aquellos países con un elevado grado de desarrollo, se está trasladando de Europa, Japón y Estados Unidos hacia países más pobres, en los cuales se ven expuestos tanto los trabajadores como la propia sociedad, debido a unos sistemas de gestión altamente ineficientes. Productos químicos tóxicos, pesticidas y residuos peligrosos que han sido prohibidos en Europa Occidental y América del Norte se fabrican, usan y reciclan a gran escala en África, el sur de Asia y América Latina. Los habitantes de estos países sufren un elevado número de intoxicaciones, enfermedades y

muerres prematuras debido a la contaminación: los trabajadores y los niños son los grupos más expuestos (Landrigan & Fuller, 2014).

Los contaminantes ambientales poseen varios efectos adversos sobre la salud ya desde las etapas más tempranas de la vida estando además implicados en enfermedades crónicas no transmisibles en la edad adulta en las que se relacionan con un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad (Jiang *et al.*, 2016). Algunos de los efectos perjudiciales más importantes corresponden a trastornos perinatales, mortalidad infantil, trastornos respiratorios, alergias, tumores, trastornos cardiovasculares y trastornos mentales entre otros (Kelishadi *et al.*, 2009; Kelishadi & Poursafa, 2010; Ventriglio *et al.*, 2021).

Los problemas relacionados con la contaminación se podrían solucionar con una identificación temprana y el desarrollo de estrategias efectivas para controlar sus niveles de exposición. Los países más desarrollados han identificado sus problemas medioambientales y, por lo tanto, desarrollado estrategias prácticas y rentables que permiten controlar las enfermedades ocupacionales y las producidas por la contaminación del medio ambiente, reduciendo los niveles presentes en el medio y obteniendo así unos beneficios sobre la salud tangibles. En los países en vías de desarrollo se está empezando a solicitar ayuda internacional para controlar y reducir sus niveles de contaminación. A pesar de ello, la contaminación ambiental no ha recibido la atención que se merece en la agenda de desarrollo internacional: para conseguir una gestión adecuada y reducir sus niveles, los programas de control de la contaminación requieren que sean asignados como un objetivo prioritario (Landrigan & Fuller, 2015).

Con ello no sólo se conseguirían unos beneficios más que evidentes sobre la salud, sino también reducir el impacto ambiental que tiene la acción humana sobre los ecosistemas y una reducción del gasto público considerable, puesto que reduciendo los niveles de emisiones de estos agentes contaminantes muchas enfermedades, especialmente aquellas de origen respiratorio y cardiovascular, conseguirían mejorarse o revertirse (Schraufnagel *et al.*, 2019), con la consiguiente reducción en el número de ingresos hospitalarios y tratamientos derivados.

Evaluación de sustancias tóxicas. El proyecto REACH

Desde que entró en vigor la normativa REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals) en la Unión Europea (UE) el 1 de junio de 2007, se están registrando de forma paulatina aquellas sustancias manufacturadas y que han estado puestas a la venta en Europa durante muchos años, algunas de ellas en grandes cantidades, sobre las cuales no se tiene mucha información acerca de sus potenciales efectos perjudiciales sobre la salud humana y sobre el medio ambiente.

Esta normativa impulsada por la Comisión Europea (CE), busca proteger la salud humana y del medio ambiente mediante la identificación temprana y adecuada de las propiedades intrínsecas de las sustancias químicas, mejorando al mismo tiempo la competitividad de la industria química de la UE. Para ello, fabricantes e importadores se ven obligados a reunir la información necesaria sobre sus sustancias químicas, fabricadas o importadas en cantidades superiores a 1 tonelada o más al año por empresa, permitiendo su correcta manipulación y su registro en la base de datos central de la Agencia Europea de Sustancias Químicas (ECHA). Esta obligación se aplica tanto a las propias sustancias como tal, así como a las presentes en mezclas. Adicionalmente, esta regulación también promueve la sustitución de aquellas sustancias químicas que se consideran altamente peligrosas por otras alternativas, siempre que éstas existan (EC, 2022a, b).

Por otra parte, la Comisión Europea, a través de la REACH, requiere que las compañías eviten realizar pruebas innecesarias en las que se empleen animales de experimentación; aquellas que deseen hacerlo deben indicar

a la ECHA los ensayos que se proponen realizar, y para los cuales deben obtener su aprobación antes de poder llevarlos a cabo. De esta forma, se favorece el uso de métodos de experimentación alternativos, reduciendo así el número de animales empleados para la experimentación, los cuales deberán emplearse sólo como último recurso.

Para poder llevar a cabo esta ambiciosa propuesta, la CE participa activamente en el desarrollo de métodos alternativos, por ejemplo, mediante el actual Programa marco de investigación: la CE dirige el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM), el cual es un referente y líder global en el campo. Además, la CE también creó el sistema de seguimiento TSAR (Tracking System for Alternative methods towards Regulatory acceptance) para garantizar que nuevos y prometedores métodos de experimentación puedan adoptarse rápidamente para uso regulatorio (EC, 2022c).

El principio de las tres Rs

La ECVAM opera bajo la directiva europea 2010/63/EU, la cual establece una serie de medidas para la protección de los animales utilizados con fines científicos o educativos, especialmente en lo relativo al reemplazo y reducción de la utilización de animales en procedimientos y en el refinamiento de la cría, el alojamiento, los cuidados y la utilización de animales en dichos procedimientos. Esto se conoce como el principio de las tres Rs (reemplazo, reducción y refinamiento), definido por primera vez en 1959 por Russel & Burch en su libro “The Principles of Humane Experimental Technique” (Russel & Burch, 1959).

El reemplazo se refiere a todos aquellos métodos en los cuales se evita o se reemplaza el uso de animales en un estudio en que se habrían usado de una forma u otra. Para llevar a cabo el objetivo de reemplazo, se dan alternativas que eviten o sustituyan el uso de animales. Esto incluye los denominados reemplazos absolutos empleando modelos informáticos (*in silico*) o bien por cultivos celulares (*in vitro*), como los reemplazos relativos, en los cuales se sustituyen animales sintientes por otros animales en los que hay evidencias científicas de que poseen una menor percepción del dolor (CCAC, 2022). Algunos ejemplos de métodos de reemplazo son:

- El uso de información ya recopilada previamente, como es el caso de metaanálisis y revisiones sistemáticas.
- Técnicas de análisis fisicoquímico (*in chemico*).
- Modelos matemáticos y computacionales (*in silico*).
- Sistemas *in vitro*.
- Estudios con personas voluntarias y aproximaciones epidemiológicas.
- Animales invertebrados con un sistema neurofisiológico menos desarrollado (*Drosophila melanogaster*, *C. elegans*...)

La reducción se refiere a cualquier estrategia que consiga reducir el número de animales empleados en un estudio, que permita obtener los datos suficientes como para responder a las hipótesis planteadas y al mismo tiempo conseguir la mayor cantidad de información posible por animal. De esta forma, se consigue limitar o incluso evitar el uso posterior de animales adicionales, siempre y cuando esto no comprometa ni perjudique la calidad de vida de los animales.

Esta reducción en el número de animales usados se puede conseguir disminuyendo el número de experimentos con animales realizados, así como limitando el número de animales empleados en cada experimento, lo cual requiere una planificación del diseño experimental cuidadosa y metódica. Además, la reducción en el número de animales también se puede conseguir compartiendo animales, tejido o datos, incluso (si fuera posible) para realizar estudios diferentes, de forma que se maximice la información obtenida de cada animal (CCAC, 2022).

Por último, el refinamiento consiste en cualquier clase de modificación en la crianza o en los procedimientos experimentales que minimicen el dolor y la angustia para los animales. Puesto que es necesario considerar el bienestar del animal a largo plazo y no sólo durante el tiempo en que se dé el procedimiento experimental, el refinamiento también se refiere a aquellos cambios que garanticen la salubridad y mejoren la zona en la que el animal pasará la mayor parte de su vida. Los métodos de refinamiento que mejoran la calidad de vida y bienestar animal también resultan beneficiosos para el estudio experimental en cuestión, puesto que mejoran la calidad de los resultados de la investigación (CCAC, 2022). Por ejemplo, el dolor y el estrés provocan una serie de alteraciones fisiológicas que resultan en un aumento de la variabilidad de los resultados obtenidos, ya que tienen un papel importante en la respuesta inmune (Domínguez-Gerpe & Rey-Méndez, 2001; Barrett *et al.*, 2021). Además, se ha observado que incluso pueden llegar a afectar a los animales que, si bien no experimentan por sí mismos estas condiciones, experimentan cambios hormonales, neurales y conductuales cuando cohabitan con un miembro que sí esté experimentando dolor (Smith *et al.*, 2016; Baptista-de-Souza *et al.*, 2022).

Estos tres principios son los que se asocian generalmente con el desarrollo de los denominados métodos alternativos. El término “alternativo” empezó a usarse en 1978, con la publicación del libro “Alternatives to Animal Experiments” de David Smyth, el cual definió este concepto como “*todos aquellos métodos que reemplacen completamente la necesidad de emplear animales de experimentación, reducir el número de animales necesarios o disminuir el dolor y/o angustia sufridos por los animales para satisfacer las necesidades básicas del hombre y otros animales*”. (Smyth, 1978).

Métodos alternativos

Uno de los mayores desafíos a la que la ECVAM se enfrenta a la hora de proponer métodos alternativos, es el de demostrar que éstos son igual de efectivos que aquellos que se basan en el uso de animales y a los cuales pretenden reemplazar. En este aspecto, un área en la que las técnicas de sustitución han demostrado ser particularmente efectivas son en las pruebas toxicológicas, ya que muchas pruebas regulatorias en las que se usaban tradicionalmente animales ahora poseen contrapartes alternativas validadas en las que se prescinde de ellos (EURL ECVAM, 2022a).

Aun así, hay que destacar que estos métodos alternativos no están lo suficientemente desarrollados para reemplazar por completo las pruebas con animales en algunos ensayos, como aquellos en los que se evalúan efectos adversos para la salud –también llamados criterios de valoración toxicológica– entre los que se incluyen (EURL ECVAM, 2022b):

- Toxicidad por exposición de dosis repetidas: relativo a los problemas asociados con la exposición a sustancias químicas durante periodos de tiempo prolongados.
- Carcinogenicidad: capacidad de un compuesto químico para provocar cáncer.

- **Toxicidad para la reproducción:** en los cuales se incluyen todos los posibles efectos adversos que pueden ocurrir en las diferentes etapas del ciclo reproductivo como consecuencia de la exposición a uno o más compuestos químicos. Incluyen los efectos sobre la fertilidad, el comportamiento sexual y la implantación del embrión.
- **Toxicocinética:** evaluación de la absorción, distribución, metabolismo y excreción de las sustancias tóxicas en el organismo.

Sin embargo, existen diferentes métodos que pueden usarse para el cribado de sustancias y determinar si es necesario tenerlas en consideración para la realización de estos ensayos. Aquí es donde cobran especial relevancia las denominadas “nuevas metodologías de abordaje” –o metodologías de abordaje no animales– (NAMs), las cuales proveen de información útil para la evaluación de peligros y riesgos que entrañan los compuestos químicos, reduciendo el uso de animales en los ensayos de toxicidad y mejorando la predictibilidad de los ensayos.

Adicionalmente estas nuevas aproximaciones suponen varias ventajas frente a las tradicionales: un ejemplo es el caso de la determinación de potenciales carcinógenos, los cuales requieren una media de dos años de bioensayos con animales. Esto, además de requerir un elevado número de animales, llega a costar millones de euros (Vanparys *et al.*, 2011). Por ello, se hace especialmente importante el desarrollo de métodos alternativos, que resultan en una serie de ensayos más rápidos, económicos y que dependen en menor medida del uso de animales. Aunque como se ha mencionado anteriormente no existe un método alternativo lo suficientemente desarrollado como para reemplazar por completo el uso de animales en estas pruebas de carcinogenicidad, los denominados “Cell Transformation Assays” (CTAs), combinados con otra serie de aproximaciones *in vitro*, parecen ser una alternativa bastante prometedora que si bien no pueden sustituir los ensayos con animales, pueden facilitar una evaluación relativamente completa del potencial carcinogénico de los compuestos (Creton *et al.*, 2012), puesto que replican con bastante fidelidad algunas de las etapas clave del proceso de carcinogénesis *in vivo*.

Otra prometedora aproximación para mejorar la evaluación de la seguridad de medicamentos y productos químicos que está cobrando fuerza en los últimos años es la aproximación mecanicista denominada “Adverse Outcome Pathways” (AOPs) (Ankley *et al.*, 2010; Leist *et al.*, 2017). Estos AOPs se basan en el entendimiento de cómo la perturbación de los procesos biológicos normales puede conducir a una alteración con resultados adversos, relacionando un evento molecular iniciador (EMI) producido por un compuesto químico o medicamento con un punto final, y los subsiguientes efectos en un organismo o en una población, a través de una cadena causal de eventos científicamente probados (OECD, 2022a) (Fig. 1).

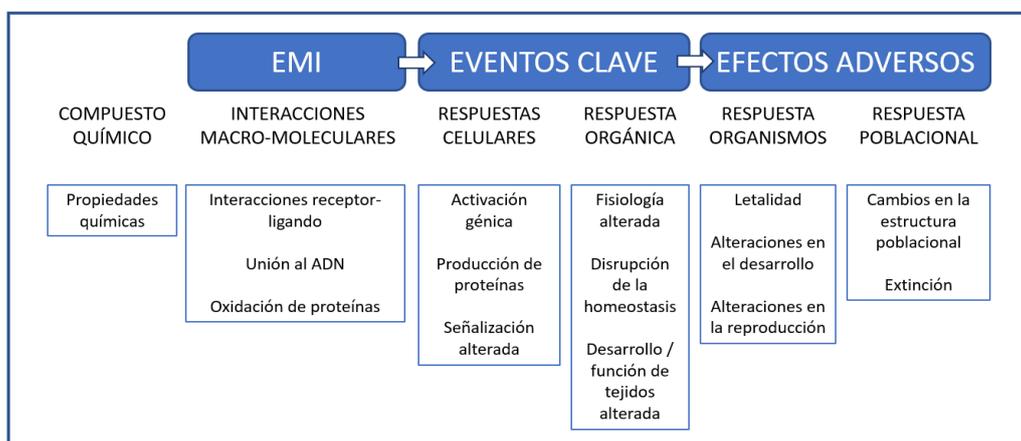


FIGURA 1. Representación esquemática de los AOPs. Modificado de OECD.org.

Como describen Burden *et al.* (2015), el factor clave que define un AOP es que fija un EMI con un efecto adverso, lo cual hace que sea de especial importancia dentro de un contexto regulatorio. Por lo tanto, un AOP debe contener un nivel de información adecuado con relación a los eventos claves causales que relacionan un EMI con un efecto adverso. Son estas propiedades las que hacen que los AOPs sean extraordinariamente útiles para el desarrollo de nuevas estrategias para la evaluación de la seguridad tanto de medicamentos como de otros compuestos químicos.

Los AOPs son fundamentalmente una manera sistemática de organizar, integrar y comunicar información y conocimientos mecanicistas; su aplicación puede ser de especial importancia para la utilización de métodos de ensayo alternativos. Una vez desarrollados, estos AOPs se pueden aplicar de dos formas diferentes:

1. Para explicar un efecto adverso observado en términos de un EMI y sus respectivos eventos clave (una aproximación “de arriba-abajo”, supeditada a la toxicología *in vivo*).
2. Para predecir el efecto adverso más probable tras la determinación del EMI y los eventos clave derivados (o aproximación “de abajo-arriba”, la cual emplea métodos no animales).

La aplicación de esta última haría posible el alejarse de la experimentación toxicológica tradicional de punto final, empleando la información biológica generada usando métodos *in silico* e *in vitro* para predecir si un compuesto químico causa unas perturbaciones específicas que lleven a unas respuestas determinadas. Como los AOPs describen la secuencia de eventos clave que conducen a unos efectos adversos que afectan a diferentes niveles de organización biológica, las aproximaciones *in vitro* de alto rendimiento (como los análisis de la expresión de genes reporteros, los cuales indican eventos moleculares y celulares específicos) pueden ser utilizadas para determinar el potencial toxicológico. Además, los AOPs también permiten extrapolar los efectos entre diferentes especies, tanto de forma cualitativa como cuantitativa, a través de la identificación de EMI comunes, eventos clave y las relaciones que se dan entre ellos.

Todo ello hace por tanto que este concepto de AOPs favorezca el desarrollo de nuevas herramientas y métodos de cribado, así como el uso de métodos alternativos que se alejen de los métodos toxicológicos tradicionales. Con el adecuado tratamiento de la información e integración de los datos obtenidos de fuentes relevantes (incluso entre diferentes disciplinas científicas), estos AOPs pueden ser de gran beneficio científico e impulsar la transición hacia los métodos alternativos (Burden *et al.*, 2015).

Como se puede ver, y especialmente en Europa con el proyecto REACH y la 7ª Modificación del Reglamento sobre productos cosméticos, se ha dado un fuerte impulso al reemplazo de los animales en la experimentación. Se han hecho grandes esfuerzos para conseguir validar muchas de estas nuevas aproximaciones experimentales, ya que no reducen los estándares de seguridad y pueden integrarse en las evaluaciones regulatorias de seguridad (Hartung, 2010). La inclusión de varios de estos métodos alternativos en la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD) y en la Conferencia Internacional en Harmonización (ICH), son buena prueba de ello (Hartung, 2011).

Modelos *in vitro* en toxicología

Los modelos *in vitro* reflejan nuestra actual comprensión mecanicista sobre los efectos de los compuestos químicos sobre la salud ambiental y humana, habiendo contribuido enormemente a la revolución biotecnológica. Cuentan además con numerosas ventajas, ya que requieren una puesta a punto relativamente sencilla, empleando cantidades pequeñas de compuestos de ensayo y obteniendo un elevado número de réplicas, miniaturización y automatización, especialmente en aquellos basados en el uso de células.

Adicionalmente, estos modelos *in vitro* representan un enfoque simplista del objeto de estudio y por lo tanto permiten una mejor interpretación de los resultados (Hartung, 2011; Zhang *et al.*, 2012).

Por otra parte, han surgido numerosas tecnologías de procesamiento rápidamente, conocidas como tecnologías “ómicas” (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica), cuyo alto rendimiento permite obtener una gran cantidad de datos acerca del impacto global de las sustancias químicas a nivel molecular en poco tiempo (Hartung, 2011). De esta forma las potenciales vías de toxicidad pueden ser identificadas, pudiendo obtener información acerca de los efectos adversos que puedan generar en células, tejidos y organismos (OECD, 2022b). Además, gracias a estas tecnologías la determinación de potenciales compuestos tóxicos en ensayos basados en modelos celulares ha evolucionado hasta tal grado que es posible determinar y estudiar un gran número de compuestos químicos a la vez en un mismo ensayo gracias a los avances en la automatización y la química combinatoria, en lo que se denomina High-Throughput Screening (HTS). Estos ensayos permiten identificar de forma altamente eficiente moléculas pequeñas biológicamente activas, las cuales son seleccionadas como candidatas para su posterior validación en experimentos biológicos o farmacológicos adicionales, y desde su implantación a principios de 1990 ha sido la mayor fuente de descubrimiento de nuevas sustancias químicas (An & Tolliday, 2010; Zhang *et al.*, 2012).

Estos métodos *in vitro* utilizan tejidos, órganos, explantes, células (tanto células primarias aisladas como ya establecidas en líneas celulares) o fracciones subcelulares (Tyson & Frazier, 1993). Recientes avances en el campo permiten el uso de cultivos celulares de tres dimensiones organoides, agregados o esferoides (Edmondson *et al.*, 2014; Rossi *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2020) e incluso la réplica de sistemas de órganos más complejos en chips, conocido como “Organ-on-a-chip”, los cuales simulan el microambiente celular y los aspectos funcionales clave de órganos vivos a escala microscópica (Zhang *et al.*, 2009). Estos cultivos celulares replican de forma bastante certera las condiciones a las que se encuentran sometidas las células y los tejidos en un organismo. Por otro lado, existen modelos celulares de prácticamente cualquier tejido o animal de laboratorio, así como de origen humano, lo que permite que puedan ser comparados. Otra ventaja de estos modelos celulares es que plantean pocos problemas de origen ético, con la excepción de aquellos tejidos de origen humano procedentes de un donante y de las células madre embrionarias (Hartung, 2011).

Los cultivos celulares de origen humano se están convirtiendo en la principal herramienta para la investigación y el desarrollo preclínico de fármacos (Fig. 2). Las tecnologías para el mantenimiento de las células en cultivo que permiten su estudio y uso para la evaluación de sustancias han mejorado de forma continua a lo largo de los siglos XX y XXI. Estos avances en las tecnologías celulares y en la bioingeniería se están acelerando y además en combinación están creando efectos sinérgicos, siendo especialmente prometedores (Pamies & Hartung, 2017).

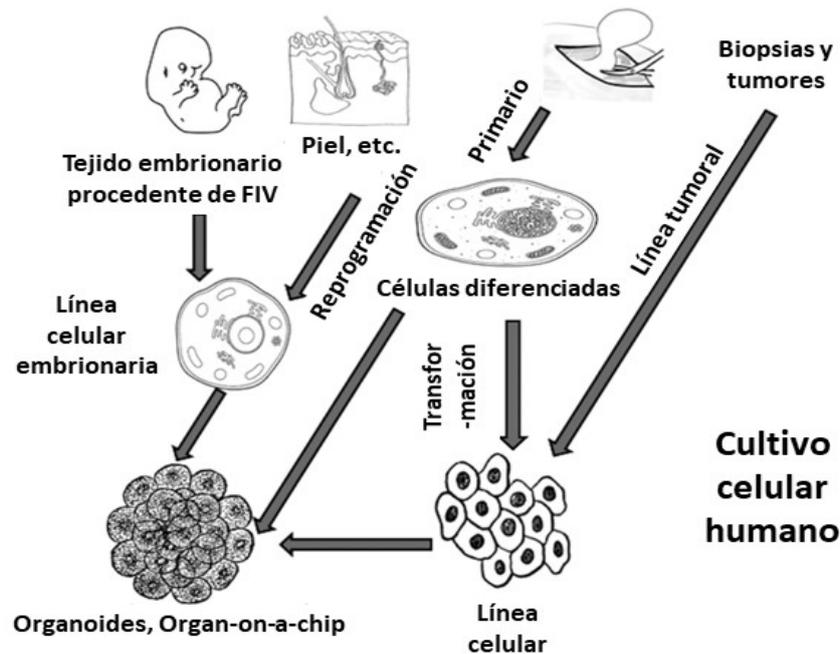


FIGURA 2. Derivación de diferentes tipos de células humanas. FIV = Fecundación *in vitro*. Modificado de Pamies & Hartung, 2017.

El uso de cultivos celulares posee una serie de ventajas con respecto a los modelos *in vivo*, tales como la consistencia y reproducibilidad de los resultados obtenidos, así como un mayor control de del entorno físico químico (p. ej. pH, temperatura, presión osmótica y niveles de oxígeno y dióxido de carbono) y fisiológico, el cual puede ser examinado constantemente. Si bien también poseen una serie de desventajas evidentes tales como necesidad de personal experimentado, técnicas de manipulación aséptica, simplicidad del modelo con respecto a las condiciones que se dan en un organismo (Arango *et al.*, 2013), permiten emplear varias fuentes y tipos de células diferentes en estos ensayos, entre ellos, líneas celulares inmortalizadas, líneas celulares de origen primario, líneas celulares cancerígenas humanas, células madre cancerosas, células madre mesenquimales, células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas (Mukherjee, 2019).

Esta clase de modelos permiten predecir resultados similares a los que se obtienen mediante aproximaciones *in vivo*, especialmente en aquellos relativos a la citotoxicidad de sustancias químicas (Bale *et al.*, 2014).

Líneas celulares

Para el desarrollo de esta tesis se han empleado tanto líneas celulares establecidas de peces, procedentes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), como de mamífero, concretamente, de origen humano (*Homo sapiens*).

1. Líneas celulares de peces (*Oncorhynchus mykiss*)

Las líneas celulares empleadas incluyen RTgill-W1 (branquias), RTgutGC (intestino) y RTL-W1 (hígado), cuyas principales características se resumen en la Tabla 2.

Estas líneas celulares ofrecen una serie de ventajas con respecto a los cultivos que emplean células de mamífero: se adaptan a un mayor rango de temperaturas, resisten mejor los cambios de presión osmótica, poseen una mayor tolerancia a la hipoxia y son más fáciles de mantener en cultivo por largos periodos de tiempo. Su uso se da tanto en la investigación básica como en la biomédica y toxicológica; también poseen

un gran potencial aplicado a la acuicultura (Goswami *et al.*, 2022). El mayor número de líneas celulares de peces disponibles provienen de aquellas derivadas de salmónidos; las de trucha arcoíris representan aproximadamente el 40% de las mismas (Perry *et al.*, 2001).

Casi todas las líneas celulares de trucha arcoíris que se han desarrollado parecen haberse inmortalizado de forma espontánea —probablemente debido a una alta actividad constitutiva de la telomerasa presente en los órganos de los individuos adultos— y son heteroploides (Bols *et al.*, 2005).

- **RTgill-W1**

Son células establecidas a partir de un cultivo primario de branquias, consiguiendo su establecimiento como línea celular continua tras un proceso espontáneo de inmortalización, manteniendo el cultivo primario durante 15 meses hasta la realización del primer subcultivo (Bols *et al.*, 1994). Poseen una morfología típica epitelial, son heteroploides y generan unos niveles relativamente bajos de eicosanoides (Holland *et al.*, 1999). Es una línea celular que se ha incorporado recientemente en la normativa ISO 21115:2019 para la determinación de la toxicidad aguda en muestras de agua y también por la OECD en la prueba nº 249 (OECD, 2021).

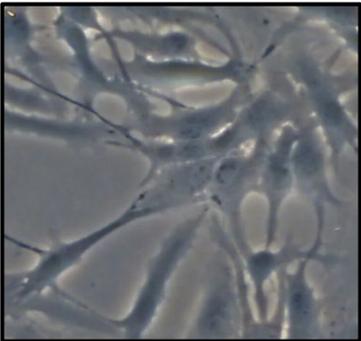
- **RTgutGC**

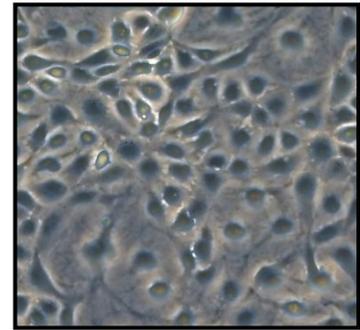
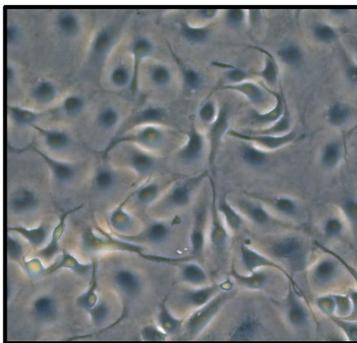
Derivan de un cultivo primario de intestino, al cual se le realizó el primer subcultivo tras 8 semanas de mantenimiento. Estas células heteroploides y con morfología típica epitelial, se caracterizan por sus propiedades intestinales específicas, como la expresión de fosfatasa alcalina (AP), que se expresa en algunas líneas de células intestinales (Kawano *et al.*, 2011) y son capaces de desarrollar una diferenciación enterocítica, presentando uniones adherentes y desmosomas entre células adyacentes (Minghetti *et al.*, 2017).

- **RTL-W1**

Se establecieron a partir de un cultivo primario de hígado, realizándose el primer subcultivo tras mantenerlo durante 5 meses. Al igual que en las otras líneas celulares, es heteroploide y posee una morfología típica epitelial, sin embargo, al alcanzar la confluencia presentan apariencia fibroblástica. Responden a inductores clásicos del gen CYP1A1, con una elevada actividad de la enzima 7-etoxiresorufina O-deetilasa (EROD), una medida indirecta de la actividad de la monooxigenasa dependiente del citocromo P-450 microsomal hepática (Lee *et al.*, 1993).

TABLA 2. Principales características de las líneas celulares de peces empleadas.

RTgill-W1	
	Código: CRL-2523 (ATCC)
	Organismo: <i>Oncorhynchus mykiss</i> (♂)
	Tejido de origen: branquia
	Tipo celular: epitelial
	Propiedades de crecimiento: adherente
	Duración del ciclo celular: aprox. 10-12 días

RTgutGC**Origen:** Dra. Kristin Schirmer**Organismo:** *Oncorhynchus mykiss* (♀)**Tejido de origen:** intestino**Tipo celular:** epitelial**Propiedades de crecimiento:** adherente**Duración del ciclo celular:** aprox. 3 días**RTL-W1****Origen:** Dra. Kristin Schirmer**Organismo:** *Oncorhynchus mykiss* (♂)**Tejido de origen:** hígado**Tipo celular:** epitelial**Propiedades de crecimiento:** adherente**Duración del ciclo celular:** aprox. 4 días

2. Líneas celulares humanas (*Homo sapiens*)

La primera línea celular humana, las células HeLa, fue establecida en 1951 a partir de una biopsia de cáncer cervical (Scherer *et al.*, 1953). Gracias al establecimiento de estas células, se realizaron importantes avances que mejoraron el entendimiento acerca de las causas que provocan el cáncer y sus posibles tratamientos. A partir de entonces se han conseguido establecer múltiples líneas celulares, las cuales han permitido generar una gran cantidad de avances y conocimiento en el campo científico, así como el desarrollo de numerosas aplicaciones prácticas como, por ejemplo, el uso para la fabricación de productos biofarmacéuticos de las líneas celulares HEK293 (células embrionarias de riñón humano) y HT-1080 (línea celular de fibrosarcoma) (Dumont *et al.*, 2016).

Las líneas celulares empleadas corresponden con las líneas Caco-2 (intestinal) y HT29-MTX (intestinal), cuyas principales características se resumen en la Tabla 3.

- **Caco-2**

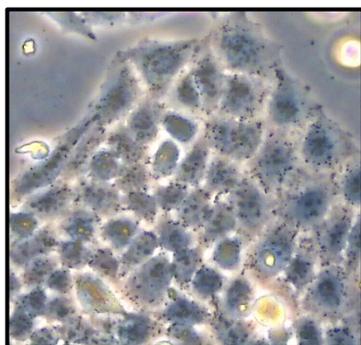
Son células que proceden originariamente de una biopsia de adenocarcinoma colorrectal, realizada en 1974 por Jorgen Fogh (Fogh *et al.*, 1977). Aunque es una de las muchas líneas celulares epiteliales que se han establecido a partir de tumores gastrointestinales, la principal característica que distingue y hace a estas células especiales es su capacidad de diferenciarse espontáneamente al alcanzar la confluencia. Esta línea celular es muy heterogénea y contiene células que presentan propiedades ligeramente diferentes entre sí; lo que explica que dependiendo de las condiciones del cultivo se seleccionen diferentes subpoblaciones celulares con propiedades que distan de las que presenta la línea celular original (Lea, 2015).

- **HT29-MTX**

La línea celular epitelial HT29, igual que lo que ocurre con las Caco-2, procede de una biopsia de adenocarcinoma colorrectal realizada por Jorgen Fogh en 1964 (Fogh & Trempe, 1975); sin embargo, esta línea en particular se obtuvo tras su tratamiento con metotrexato, lo que provocó el crecimiento de una subpoblación resistente al mismo y, por lo tanto, se encuentra especializada en la secreción de mucus, confiriéndoles la capacidad de diferenciarse en células caliciformes maduras (Lesuffleur *et al.*, 1990). Este fenotipo secretor se ha empleado en los estudios de transporte de diferentes compuestos, tanto para estudios relativos a la adhesión y supervivencia de microorganismos como para evaluar las propiedades inductoras de moco de diferentes compuestos alimenticios (Gagnon *et al.*, 2013; Martínez-Maqueda *et al.*, 2015). En la mayoría de los casos estos estudios se realizan con co-cultivos de Caco-2 y HT29-MTX, puesto que son un modelo bastante preciso que emula las condiciones fisiológicas y tiene en cuenta la capa de mucus (Yuan *et al.*, 2013).

TABLA 3. Principales características de las líneas celulares humanas empleadas.

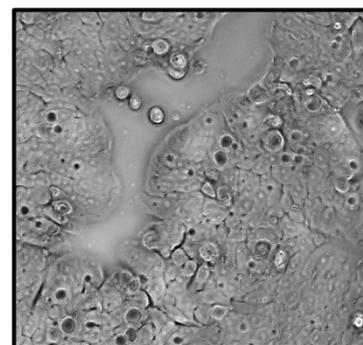
Caco-2



Código: HTB-37 (ATCC)
Organismo: *Homo sapiens* (♂)
Tejido de origen: adenocarcinoma colorrectal
Tipo celular: epitelial
Propiedades de crecimiento: adherente
Duración del ciclo celular: aprox. 3-4 días

HT29-MTX

Código: 15121711 (ECACC)
Organismo: *Homo sapiens* (♀)
Tejido de origen: adenocarcinoma colorrectal
Tipo celular: epitelial
Propiedades de crecimiento: adherente
Duración del ciclo celular: 1 día



Crterios generales sobre el diseño de experimentos en toxicología

Hace 500 años, Paracelso determinó que “todas las cosas son veneno y no hay ninguna que no lo sea; sólo la dosis correcta diferencia al veneno del remedio”; incluso los constituyentes corporales endógenos y los productos alimenticios pueden llegar a producir efectos deletéreos en cantidades excesivas y durante periodos prolongados de tiempo (Rozman *et al.*, 2010).

La toxicidad de un compuesto químico varía en función de la exposición del compuesto o droga sobre las células, y esta exposición a su vez es dependiente de la dosis y del tiempo. Una dosis aguda puede llegar a provocar efectos crónicos y a su vez, la exposición repetida de múltiples dosis puede desencadenar un episodio de toxicidad fulminante. En cuanto al tiempo, se considera como una variable con designaciones semi cuantitativas en términos de exposición aguda, subaguda, subcrónica y crónica: por lo tanto, la toxicidad se puede clasificar de acuerdo con la naturaleza o la duración del daño involucrado (Rozman *et al.*, 2010).

De esta forma podemos definir la toxicidad como la acumulación de efectos deletéreos durante periodos de tiempo cortos o largos y que desembocan en la incapacidad de un organismo para mantener sus funciones vitales dentro de los límites de su capacidad de adaptación u otras formas de recuperación. En la toxicología moderna, se determinan las respuestas a la exposición en un sentido más amplio, consistente en las dosis-respuesta y tiempo-respuesta, estableciendo umbrales prácticos que definen la seguridad de los productos químicos (Rozman *et al.*, 2010).

Es por ello por lo que a la hora de diseñar un experimento que nos permita determinar los potenciales efectos tóxicos de diferentes xenobióticos, se deben tener en cuenta una serie de consideraciones. Por un lado, un buen diseño experimental nos permitirá obtener unos resultados robustos, fiables y reproducibles, que permitirán la implementación del protocolo en el laboratorio y emplearlo de forma rutinaria. Por otro lado, el uso de un procedimiento común permitirá comparar resultados y realizar una mejor interpretación de los resultados obtenidos tanto por diferentes laboratorios como por diferentes disciplinas científicas. Incluso, pueden llegar a ser utilizados para tomar decisiones que permitan emplear dichos procedimientos para su uso regulatorio, ya que éstos permiten la extrapolación de los datos obtenidos en estos ensayos con una situación *in vivo* en particular (Walum *et al.*, 1994; Michaud *et al.*, 1995).

A grandes rasgos, según Michaud *et al.*, 1995 esto se traduce en el desarrollo de una estrategia que permita medir las respuestas frente a dosis seleccionadas, tanto al analizar los compuestos de forma individual como al estar presentes en mezclas, para posteriormente emplear modelos matemáticos que nos ayuden a determinar si los compuestos presentan algún tipo de interacción entre sí, ya sean sinérgicos, antagónicos o, por el contrario, no interaccionan entre ellos. Esta determinación es posible al analizar los datos obtenidos, evaluando las posibles diferencias en función de si resultan ser o no estadísticamente significativas.

Este diseño consta de una serie de pasos:

1. Selección de los componentes de estudio.
2. Realización de experimentos preliminares que permitan establecer un rango de dosis, especies químicas de los compuestos y tiempos de incubación que deben emplearse.
3. Diseño de los experimentos de interacción (selección de dosis, combinaciones y variables a evaluar específicas).
4. Medida de las dosis-respuesta, tanto de forma individual como en las mezclas que se han seleccionado en el diseño experimental.
5. Uso de modelos matemáticos para analizar los datos e interpretación de los resultados.

Una vez que se han seleccionado los compuestos de estudio, la realización de experimentos preliminares con cada uno de los compuestos tóxicos por separado es útil para determinar el rango de dosis y la duración de la exposición/incubación de los compuestos que producen cambios evaluables en las variables de interés examinadas. Estos experimentos preliminares nos permiten caracterizar la curva dosis-respuesta de cada

compuesto químico por separado y evaluarlo a diferentes tiempos de exposición. De esta forma, es posible interpretar las respuestas que se dan cuando los compuestos químicos se presentan en mezclas, ya que los valores de concentración efectiva media o EC_{50} (concentración de un compuesto tóxico necesaria para producir un efecto particular en el 50% de la población, bajo determinadas condiciones) obtenidos se pueden utilizar para el diseño de los experimentos de interacción. Además, permite hacerlo de forma efectiva, pudiendo determinar la posible presencia y la naturaleza de la interacción, así como la obtención de información que permita caracterizar su dosis-respuesta.

La selección de dosis para las mezclas de compuestos puede basarse en la comprensión de la relación dosis-respuesta de los compuestos tóxicos individuales y en el conocimiento del tipo y grado de la supuesta interacción. Si esto se desconoce, es recomendable mantener las dosis de los componentes de la mezcla dentro del rango determinado para los compuestos tóxicos por separado. Por otro lado, evaluar las respuestas de los compuestos tóxicos por separado, así como en mezclas en el mismo experimento ayuda a reducir la variabilidad interexperimental; la correcta interpretación de las respuestas obtenidas en la evaluación de las mezclas depende fundamentalmente de la correcta caracterización de las respuestas obtenidas frente a los compuestos de forma individual, puesto que deben ser comparadas entre sí (Michaud *et al.*, 1995).

Una vez obtenidos los datos generados en los experimentos, se emplean diferentes métodos estadísticos para analizarlos. Los denominados datos “crudos” obtenidos no tienen por qué utilizarse directamente para la realización de los análisis estadísticos, sino que en la mayoría de las ocasiones deben ser transformados. De esta forma, la citotoxicidad puede expresarse en porcentaje, relativizado en función de los controles que hayamos empleado en el experimento. Éstos normalmente involucran a aquellas unidades experimentales en las que, o bien no se ha añadido ningún tratamiento, o bien se ha empleado el vehículo en el que se ha disuelto el compuesto de estudio (Philip Morris International, 2022). Los métodos estadísticos que se emplean para determinar las posibles diferencias entre controles y tratamientos, la existencia de interacciones en mezclas, así como para otro tipo de determinaciones, dependen básicamente del diseño del estudio; un buen diseño experimental permitirá un análisis directo (Casella, 2008).

Por lo tanto, lo que se pretende en última instancia con este diseño experimental es identificar cambios funcionales en respuesta a un compuesto químico específico empleando para ello modelos celulares; las dianas pueden involucrar a moléculas específicas o a una ruta de señalización en particular, incluso a toda la célula en sí (Mukherjee, 2019). Estos ensayos con cultivos celulares resultan especialmente útiles para la detección de los efectos de citotoxicidad; ésta se define como la toxicidad provocada por la acción de agentes químicos sobre las células, afectando a las estructuras y/o procesos cruciales para el mantenimiento celular, tales como la proliferación, supervivencia y la actividad bioquímica y fisiológica normal (Brandelli *et al.*, 2017).

De esta forma se pretende evaluar *in vitro* los efectos producidos por un compuesto químico y evaluar la proliferación celular, basándose en la ratio de células vivas y muertas. Los parámetros que determinan la viabilidad celular se basan en el potencial redox de las poblaciones celulares, la integridad de las membranas celulares e incluso de la actividad enzimática celular, los cuales se evalúan empleando varios colorantes diferentes, tales como el Alamar Blue o el rojo neutro. Estos colorantes permiten diferenciar el estado celular dependiendo del color, ya que las células son diferenciadas en función de la ratio de absorción/exclusión del colorante dependiendo de su integridad metabólica. Una vez determinado el efecto de los compuestos químicos sobre las células, es posible optimizar las condiciones del cultivo celular basándose en la citotoxicidad ejercida por los mismos (Mukherjee, 2019).

Como se ha mencionado anteriormente, la citotoxicidad basal es un buen indicador para determinar la toxicidad aguda de los compuestos químicos *in vivo* (Bale *et al.*, 2014). De hecho, las pruebas de citotoxicidad basal se correlacionan bastante bien con los valores de toxicidad aguda obtenidos en animales y humanos. De esta forma, los valores de EC_{50} se correlacionan con los correspondientes con la dosis letal media o LD_{50} (concentración a partir de la cual, bajo condiciones controladas, el efecto es letal en el 50% de la población) tanto en ratones como en humanos (Clemenson *et al.*, 2002). Por lo tanto, cuando se predice que un compuesto es tóxico se puede anticipar que en la mayoría de los casos esto se traducirá en que se producen daños a nivel celular, así como una alteración de las funciones y propiedades intrínsecas de las células. De esta forma se pueden identificar compuestos que son potencialmente dañinos para determinados tejidos e, incluso, identificar efectos no específicos (Eisenbrand *et al.*, 2002).

Contaminantes emergentes

La contaminación ambiental supone un grave perjuicio, tanto a nivel ambiental como para la propia salud humana (Fuller *et al.*, 2022), y afecta a la propia economía, ya que supone un elevado gasto público el tratar de paliar y controlar sus efectos. Por otro lado, el hecho de que tengan su origen en múltiples fuentes diferentes hace que el seguimiento de posibles agentes contaminantes sea complejo (Lillini *et al.*, 2021) y que por lo tanto haya numerosos compuestos candidatos de los cuales aún no se han realizado los estudios suficientes.

Dentro de este contexto, se encuentran los denominados contaminantes emergentes (CEs), también llamados contaminantes de preocupación emergente (CPE), los cuales son un grupo de sustancias contaminantes de origen tanto sintético como natural, así como los productos resultantes de su transformación, que no son monitorizados normalmente y poseen tanto la capacidad de ingresar al medio ambiente como la de causar efectos adversos en el propio medio al igual que para la salud humana (Rosenfeld & Feng, 2011; Gao, 2022). Esta clase de sustancias se han convertido en una preocupación global en los últimos años ya que además de ser persistentes tóxicos y bioacumulables en humanos y animales, están siendo detectados de forma ubicua tanto en el suelo como en el agua de los ecosistemas (Gao, 2022). Por otro lado, apenas existe una normativa que regule a estos CEs y tampoco son eliminados de forma efectiva por los actuales procedimientos convencionales de tratamiento de las aguas residuales en las plantas depuradoras (Antunes *et al.*, 2021), lo cual, combinado con su potencial de causar efectos adversos incluso a dosis bajas, ha hecho que haya un interés creciente por identificar su origen, destino, transformación e impacto (Siziba & Sero, 2022).

Existen varias formas de clasificación de los CEs; la lista de compuestos y sustancias químicas que pertenecen a este colectivo es notablemente grande, y se encuentra en constante expansión (Agüera *et al.*, 2013). El proyecto NORMAN (Network of reference laboratories, research centres and related organisations for monitoring of emerging environmental substances), fue establecido en 2005 por la Comisión Europea, y se fundó con el objetivo de crear una red permanente de laboratorios de referencia y centros de investigación –integrando a su vez academia, industria, organismos reguladores gubernamentales y ONGs– (Dulio *et al.*, 2018), con el objetivo de clasificar y categorizar los CEs presentes en el medio, así como sus productos de biotransformación. En esta lista, estos CEs se encuentran divididos en 30 clases diferentes, en función de su origen y tipo (NORMAN Network, 2022).

Además, los CEs fueron registrados en el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, el cual entró en vigor el 17 de mayo de 2004. Actualmente se encuentran regulados por la REACH (desde la aplicación del reglamento europeo 1907/2006) y restringidos bajo la Regulación Europea (UE) de Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) 2019/1021 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de

junio de 2019 sobre contaminantes orgánicos persistentes, cuyo objetivo es el de eliminar la producción, comercialización y uso de productos químicos, gestionar las reservas y desechos y el establecimiento de medidas que ayuden a reducir la liberación de los COPs producidos de forma inintencionada. En algunas materias, esta Regulación va más allá de los acuerdos internacionales, enfatizando el objetivo de eliminar el uso y producción de los COPs reconocidos internacionalmente (EC, 2022d; Grobelak & Kowalska, 2022).

Como ya se ha mencionado, los CE se pueden clasificar de formas diferentes; en función de su tamaño y estructura, se pueden dividir en dos grandes categorías: químicos de preocupación emergente (QPEs) y partículas de preocupación emergente (PPEs) (Gao, 2022).

Dentro de esta primera categoría perteneciente a los QPEs, comúnmente se incluyen compuestos perfluorados (PFCs), productos farmacéuticos y de cuidado personal (PFCPs), químicos industriales, retardantes de llama (FRs), pesticidas, subproductos de desinfección del agua, protectores solares/filtros UV, toxinas de algas, compuestos disruptores endocrinos, entre otros (Richardson & Ternes, 2014; Rodríguez-Narvaez *et al.*, 2017). La segunda categoría (PPEs) comprende principalmente dos tipos de contaminantes particulados, nanopartículas diseñadas (ENPs) y microplásticos (MPs) (Gao, 2022).

Aun así, algunos compuestos químicos que poseen estructuras y características químicas diferentes pertenecen a la misma categoría; es por ello por lo que normalmente se acaban clasificando de forma que solo queden recogidas en unas pocas clases, tal y como se muestra en la Fig. 3.

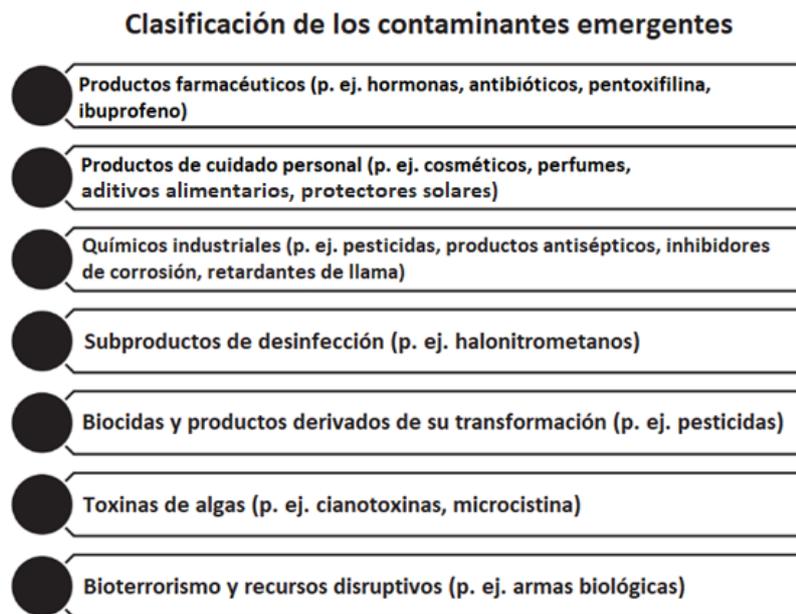


FIGURA 3. Clasificación de los contaminantes emergentes. Modificado de Grobelak & Kowalska, 2022.

Las actividades antropogénicas tales como las relacionadas con la agricultura, la industria y las domésticas hacen que estos CE acaben siendo descargados en el medio ambiente. Por otra parte, el consumo constante y descontrolado de medicamentos debido a la mala gestión médica en lo relacionado con el tratamiento de enfermedades, y la tendencia y uso frecuente de productos de cuidado personal, hace que diferentes subproductos sean liberados a bajas concentraciones (Ebele *et al.*, 2017; Abdulrazaq *et al.*, 2020). Estos subproductos generados por la biotransformación de los compuestos primarios podrían llegar a ser incluso más tóxicos que los propios compuestos de los que derivan (Buttiglieri & Knepper, 2008). La mayoría de los CE acaban en las aguas residuales, no siendo tratados de forma efectiva en las plantas depuradoras (o incluso siendo descargados directamente), por lo que no son eliminados (Geissen *et al.*, 2015). Este problema

requiere por tanto la necesidad de enfocarse en los riesgos medioambientales que conlleva la presencia de los CE en el medio ambiente; conocer las principales rutas de entrada en el medio es importante para determinar su destino final (Fig. 4). El hecho de que se estén hallando niveles traza de estos CE en las aguas superficiales indica que acaben afectando a los organismos acuáticos, así como a la propia población humana (Gobelak & Kowalska, 2022). Algunos productos farmacéuticos no son metabolizados por el organismo tanto en humanos como en animales, lo que hace que acaben siendo excretados en su forma biológicamente activa. Estas formas tienen el potencial de ejercer un impacto significativo sobre organismos no específicos, tales como los peces, anfibios, etc., que habitan estos medios acuáticos, además de acabar provocando resistencia a los antibióticos en numerosos microorganismos (Dey *et al.*, 2019).

Además, debido a que la concentración de los CE en el medio ambiente es muy baja, del rango de ng/L hasta $\mu\text{g/L}$, (Pal *et al.*, 2014) son muy difíciles de detectar sin la ayuda de instrumentos analíticos sofisticados como son la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) y la cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (Gao, 2022).

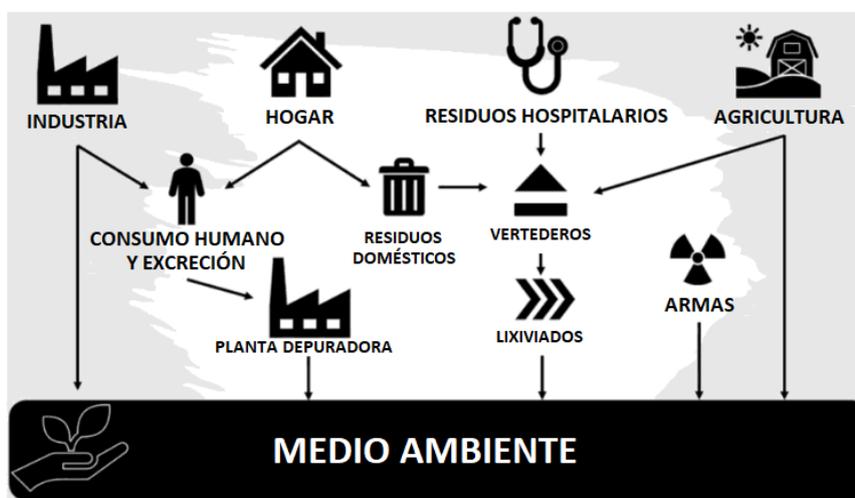


FIGURA 4. Principales rutas de entrada de los contaminantes emergentes en el medio ambiente. Modificado de Gobelak & Kowalska, 2022.

Mezclas de contaminantes

Puesto que la mayoría de CE tienen como destino masas de agua naturales, podemos decir que estas se están convirtiendo en complejas mezclas de contaminantes, sin tratar o tratados de forma parcial, que sufren procesos de recirculación y reintroducción en el medio, por lo que se encuentran de forma permanente en él (Dey *et al.*, 2019).

Aunque normalmente se suelen evaluar los compuestos tóxicos por separado, la realidad es que nos vemos expuestos diariamente a mezclas complejas de sustancias químicas presentes en nuestro entorno. Las actuales aproximaciones regulatorias para la determinación de los riesgos asociados a los productos químicos se basan generalmente en la evaluación de sustancias individuales. Aunque estas determinaciones incluyen ciertos márgenes de seguridad que tienen en cuenta las posibles incertidumbres, como la forma en la que la exposición a múltiples químicos diferentes puede afectar tanto a los seres humanos como al medio ambiente, esto no provee de información suficiente y hace que sea necesario abordar estas mezclas de una forma más sistemática (EC, 2022e).

Por ello, el Consejo de Medio Ambiente adoptó una serie de conclusiones acerca de los efectos ejercidos por las combinaciones químicas el 22 de diciembre de 2009. En dichas conclusiones el Consejo invitó a la Comisión Europea a evaluar el cómo y si la legislación existente abordaba dicho problema, al igual que a sugerir las modificaciones y directrices que considerase pertinentes. El 31 de mayo de 2012 la Comisión emitió un informe, en el cual, se comprometía a promover nuevos procedimientos que garantizaran que los riesgos asociados a estas mezclas de compuestos químicos fuesen correctamente entendidas y evaluadas, ya que, aunque la legislación imponía limitaciones estrictas en relación con las cantidades de compuestos químicos en particular, rara vez se habían examinado sus efectos en combinación (EC, 2022e).

El número de posibles combinaciones de compuestos químicos es enorme, lo que hace que no sea realista ni posible el estudiarlas todas. Es por ello por lo que se deben desarrollar metodologías que permitan evaluar o determinar los efectos de estas combinaciones y cuáles son las prioritarias a estudiar, aspecto en el cual hasta el momento no se ha conseguido desarrollar una estrategia sistemática, completa e integrada (EC, 2022e). Por otra parte, la relevancia de las interacciones a niveles de exposición realistas en humanos y en el medio ambiente es controvertida. Mientras que algunos autores han encontrado interacciones sinérgicas en algunas mezclas de compuestos químicos al ser evaluadas en organismos acuáticos (Thorpe *et al.* 2001; Cleuvers, 2003), otros evidencian que las interacciones entre los compuestos químicos presentes en las mezclas que pueden encontrarse en el medio ambiente son raras y que, de darse, se desvían ligeramente de lo que se observa en las predicciones basadas en efectos aditivos de muchos contaminantes coexistentes (Boobis *et al.*, 2011; Cedergreen, 2014).

Aun así, la aplicación de NAMs está resultando prometedora para la generación de datos de toxicidad y de composición química de las mezclas, con un alto rendimiento y refinando la evaluación de los potenciales efectos que tienen estas mezclas sobre la salud humana (Luo, 2022).

Para el desarrollo de esta tesis se seleccionaron mezclas de un retardante de llama bromado (BFR), el tetrabromobisfenol A (TBBPA), uno de los BFRs más comunes y presentes en el medio ambiente, con nanopartículas de poliestireno (PSNPs), uno de los CEs que más interés está suscitando actualmente debido a la creciente preocupación global que se está generando en torno a los plásticos.

Retardantes de llama bromados (BFRs)

Los BFRs son compuestos químicos sintéticos añadidos a una gran variedad de productos para hacerlos más resistentes a la combustión. Se aplican comúnmente sobre materiales tales como polímeros, plásticos, madera y material textil. Muchos de ellos han sido identificados como persistentes, bioacumulativos y tóxicos (Waijers & Parsons, 2016), lo que los clasifica como COPs. Aproximadamente el 21% de los retardantes de llama que se encuentran disponibles contienen átomos de bromo en su estructura química, fracción que le otorga a los mismos sus propiedades como retardante de llama (Hardy, 2004). Esta fracción halógena captura los radicales libres (agentes altamente oxidantes) que se producen durante el proceso de combustión, responsables de la propagación de las llamas.

El principal criterio para usar un compuesto como un retardante de llama radica tanto en su estabilidad durante la vida útil del producto al que se le va a aplicar, como en que sea compatible con el polímero en cuestión; esto hace que haya más de 75 compuestos alifáticos, aromáticos y ciclo alifáticos que son empleados como BFRs (Alaee *et al.*, 2003).

Estos BFRs son descargados al medio ambiente a través de una gran cantidad de fuentes puntuales tales como plantas de reciclaje, fábricas, aguas residuales, vertederos, entre otros; estando presentes de forma ubicua

en el medio ambiente. En el futuro, y debido al cambio climático, fuentes como los glaciares y el permafrost podrían llegar a adquirir una especial relevancia (Law & Herzke, 2010; Zheng *et al.*, 2011).

Los BFRs se dividen en 3 subgrupos, dependiendo del modo de incorporación de estos compuestos sobre los polímeros:

- Retardantes de llama aditivos: se mezclan directamente con los polímeros, como es el caso de los polibromodifenil éteres (PBDEs), los hexabromociclododecanos (HBCDDs) y los polibromobifenilos (PBBs).
- Retardantes de llama reactivos: se unen a los polímeros de plástico de forma covalente, como es el caso del TBBPA.
- Monómeros bromados: se usan en la producción de polímeros bromados, los cuales son mezclados con otros polímeros no halogenados o introducidos en la mezcla antes del proceso de polimerización, originando un polímero que contiene una mezcla de monómeros. Básicamente, los átomos de bromo se incorporan en la estructura del polímero, lo que resulta en una estructura química más estable y de mayor peso molecular, por lo que presentan una menor biodisponibilidad; algunos ejemplos consisten en el butadieno y el poliestireno bromados (BPS), utilizado para sustituir a algunos BFRs tradicionales (Alaee *et al.*, 2003; Guerra *et al.*, 2010).

La diferenciación de estos BFRs en estas categorías tiene un importante significado medioambiental, puesto que los BFRs reactivos son más estables y no suelen ser liberados al medio, como ocurre con los aditivos (Hutzinger & Thoma, 1987; Covaci *et al.*, 2009).

En Europa, el uso de los polibromobifenilos (PBBs) fue restringido por la 4ª Modificación de la Directiva 76/769/CEE adoptada en 1984, relativa a la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos, cesando la producción de PBBs de forma voluntaria en el 2000. Sin embargo, para acelerar estos procesos, esta Directiva fue derogada e incorporada a las regulaciones de la REACH (Kemmlin *et al.*, 2009). En EE. UU. su producción cesó en 1974 tras un incidente en el que estos BFRs acabaron en el pienso del ganado, y, por consiguiente, en los productos de consumo derivados (Kay, 1977; Darnerud, 2003; Guerra *et al.*, 2010).

Los polibromodifenil éteres (PBDEs) fueron los BFRs más utilizados en las últimas décadas, sin embargo, graves problemas relacionados con sus efectos sobre la salud y el medio ambiente hicieron que se interrumpiese su uso y fabricación en todo el mundo. Los hexabromociclododecanos (HBCDDs) y el TBBPA son actualmente dos de los BFRs más usados, representando el TBBPA aproximadamente el 60% de la producción mundial de BFRs (Covaci *et al.*, 2009; Altarawneh *et al.*, 2019).

Puesto que los BFRs deben ser estables y se emplean sobre polímeros que igualmente poseen una vida media elevada, poseen unas características favorables que hacen que persistan en el medio ambiente durante varios años (Guerra *et al.*, 2010). Cuando estos BFRs son liberados al medio, tienden a dividirse y acumularse en los sedimentos, como resultado de su hidrofobicidad. Una vez en ellos, los microorganismos son capaces de desbromar los BFRs bajo condiciones anaeróbicas, lo cual puede llegar a aumentar la toxicidad de estos (Waaijers & Parsons, 2016). También pueden sufrir otra serie de procesos de degradación, como la fotoquímica y térmica, que dan lugar a otros productos químicos que pueden llegar a ser igual o más tóxicos que los compuestos de los que derivan: como es el caso de las dioxinas y furanos polibromados (PBDDs y PBDFs), resultado de la degradación térmica de los PBDEs (Eljarrat *et al.*, 2011).

Por otro lado, gracias a su hidrofobicidad tienden a bioacumularse en la biota y biomagnificarse en la red trófica (Sellström *et al.*, 1993; Alaee & Wenning, 2002); en muchos casos los niveles más elevados de BFRs se encuentran en la fauna de los medios acuáticos. También se han encontrado BFRs en la leche materna, sangre y tejido adiposo humanos (Watanabe & Sakai, 2003; Darnerud, 2003). Las principales vías de exposición a estos BFRs (Fig. 5) son a través de la dieta (productos con alto contenido lipídico, incluyendo la leche materna), vía aérea (material particulado) e ingestión de polvo, siendo estos dos últimos especialmente importantes en la exposición ocupacional (Yang *et al.*, 2018); llegando incluso a darse por vía dérmica (Sjödín *et al.*, 1999; Frederiksen *et al.*, 2009; Toms *et al.*, 2010).

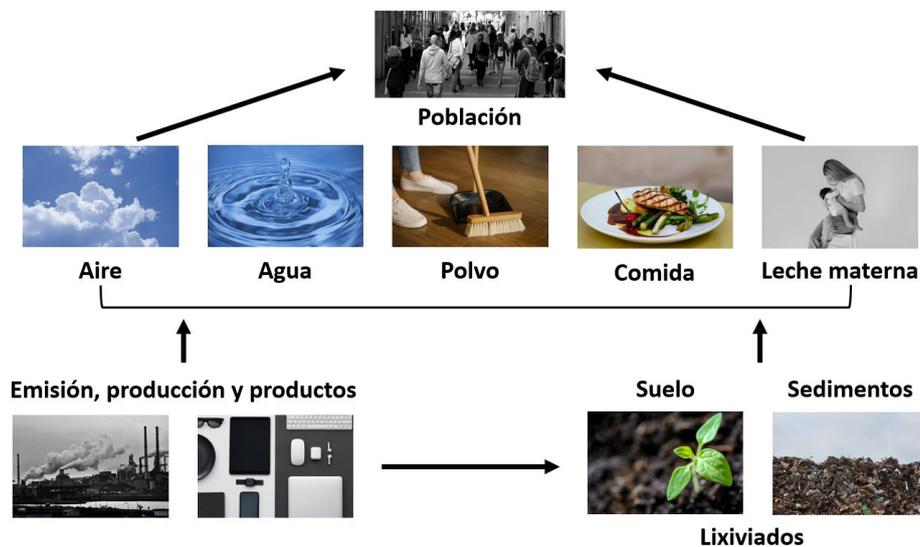


FIGURA 5. Representación esquemática de las fuentes y rutas de los BFRs. Modificado de Toms *et al.*, 2010.

Tetrabromobisfenol A (TBBPA)

El TBBPA es un retardante de llama con un consumo global de aproximadamente 240.000 toneladas al año, lo que lo convierte en el BFR de mayor producción en el mercado (Alaee *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2020). Las tres zonas de mayor producción de TBBPA en el mundo incluyen China, EE. UU. y Oriente Medio; sólo en China la producción anual de TBBPA es de 180.000 toneladas aproximadamente. Además, se espera que el mercado global de TBBPA aumente un 3,8% en los próximos cinco años (Zhou *et al.*, 2020).

El TBBPA se produce por el bromado del bisfenol A (BPA) en un solvente orgánico, como metanol o halocarburos, ácido hidrobromico al 50% o alquil-monoéteres acuosos (Covaci *et al.*, 2009). Aproximadamente el 90% del TBBPA es usado como reactivo intermediario en la producción de resinas epoxi y de policarbonato: la principal aplicación de las resinas epoxi es su uso en la manufacturación de placas de circuito impresas que contienen un 20% de bromo aproximadamente. El 10% restante es transformado en derivados tales como el dimetil TBBPA y usado como un BFR aditivo en las resinas de acrilonitrilo-butadieno-estireno (ABS) y en poliestirenos de alto impacto. El TBBPA bis (2-hidroxietil éter), otro derivado del TBBPA, se emplea como un retardante de llama en pegatinas, recubrimientos y adhesivos textiles (Alaee *et al.*, 2003).

A pesar de que el TBBPA se encuentra unido de forma covalente a los polímeros, se ha detectado su presencia en el medio ambiente (Alaee *et al.*, 2003); esto puede deberse en parte a su uso como BFR aditivo en la fabricación de acrilonitrilo butadieno estireno (ABS) que se encuentra en teléfonos, neveras..., carcasas de televisión, monitores de ordenador, máquinas de café, impresoras, fotocopiadoras, aspiradoras y enchufes (Covaci *et al.*, 2009; Okeke *et al.*, 2022). Aunque no se conoce exactamente cuándo comenzó la fabricación del TBBPA, fue detectado en 1983 en los sedimentos del río Neya en Japón (Watanabe *et al.*, 1983).

Actualmente este BFR se encuentra ampliamente extendido, encontrándose en el aire, suelo, polvo, sedimentos y lodos residuales de diferentes localizaciones, llegando incluso a lugares tan lejanos como el Mar del Norte (Morris *et al.*, 2004; Covaci *et al.*, 2009; Guerra *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2020). Aunque también se puede encontrar en el agua, su baja solubilidad (0.72 mg/mL), su naturaleza lipofílica y el ser altamente volátil, hace que encontrarlo en muestras de agua sea relativamente raro, viéndose favorecida por tanto su presencia en el aire, suelo y sedimentos (Watanabe *et al.*, 1983; Watanabe & Sakai, 2003; Feiteiro *et al.*, 2021).

Igual que ocurre con otros BFRs, los humanos se ven expuestos al TBBPA de varias formas, siendo las principales vías a través de la dieta (alimentos contaminados, leche materna), inhalación (polvo, material particulado) y por vía dérmica (películas orgánicas de los materiales plásticos) tal y como se resume en la Fig. 6. Además, se ha detectado en varios tejidos humanos, como son la sangre, tejido adiposo, leche materna y cordón umbilical (Zhou *et al.*, 2020; Okeke *et al.*, 2022).

El TBBPA está registrado en la ECHA y es clasificado como una sustancia altamente tóxica para los organismos acuáticos, con efectos altamente persistentes. Además, se tienen sospechas de que pueda provocar cáncer y se está evaluando como posible disruptor endocrino (ECHA, 2022).

Numerosos estudios en animales sugieren que el TBBPA es tóxico para el desarrollo, afectando fundamentalmente a la fisiología del hígado y riñón (Szymańska *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2011; Dunnick *et al.*, 2017), así como alterando los sistemas nervioso (Lilienthal *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2017), reproductivo (Meerts *et al.*, 2001) y endocrino (Van der Ven *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2020). Sin embargo, varios estudios con ratas demuestran que las exposiciones subagudas o crónicas de TBBPA tanto de forma oral, como por vía dérmica e inhalatoria no producen efectos destacables (Darnerud, 2003; Covaci *et al.*, 2009). Incluso en trabajos que identifican efectos deletéreos a altas dosis, se indica que no se observan efectos cuando éstas son bajas (Dunnick *et al.*, 2017) o que, de haber alteraciones, no tienen relevancia biológica ni toxicológica (Osimitz *et al.*, 2016).

Por otro lado, en organismos acuáticos sí parece haber efectos más perniciosos, sobre todo en etapas de desarrollo tempranas en peces cebra (Wu *et al.*, 2016; Parsons *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2021), en los que además se ha visto que actúa como disruptor endocrino incluso a dosis bajas; además, se han observado movimientos erráticos, sacudidas e irritación en ciertas especies, como la trucha arcoíris (IPCS, 1995). También se han visto efectos tóxicos sobre algunas especies de algas marinas y de agua dulce (Darnerud, 2003).

En cuanto a su evaluación empleando modelos *in vitro*, se han empleado diversos modelos celulares para determinar sus efectos y mecanismos de acción (Zhou *et al.*, 2020). Fundamentalmente se ha observado que el TBBPA causa daño celular mediante inducción de estrés oxidativo/aumento de peroxidación lipídica, disfunción mitocondrial, y apoptosis afectando a la función de varios tejidos y órganos (Nakagawa *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019). También se ha visto que ejerce efectos en el sistema inmune (Watanabe *et al.*, 2010) y que actúa como un disruptor endocrino, actuando tanto como agonista como antagonista de la triyodotironina (T3) (Kitamura *et al.* 2002; Sun *et al.*, 2009; Graselli *et al.*, 2014). Se ha sugerido incluso que la toxicidad ejercida por el TBBPA es mayor que la del bisfenol A, fundamentalmente debido a la participación de los átomos de bromo (Nakagawa *et al.*, 2007; McCormick *et al.*, 2010; Yang & Chan, 2015).

La posible explicación a estos resultados contradictorios podría darse en que la mayoría de las concentraciones evaluadas en dichos estudios exceden significativamente los niveles que se detectan en el medio ambiente. Además, en muchos de los estudios realizados y especialmente en los más antiguos, los investigadores fueron incrementando las concentraciones de TBBPA hasta que detectaron un efecto adverso, sin tener en cuenta las dosis de exposición que son relevantes. Sin embargo, estos estudios son útiles para

discernir los potenciales mecanismos de toxicidad que ejerce el TBBPA. Por otro lado, algunos modelos empleados pueden llegar a ser más sensibles que otros, lo cual también debe tenerse en cuenta, al igual que las limitaciones de los modelos *in vitro*, ya que se desdeñan los procesos de absorción, distribución, modificación y excreción (Zhou *et al.*, 2020). El TBBPA es absorbido por el tracto gastrointestinal y metabolizado rápidamente, ya que se conjuga con la bilis, haciendo que haya una menor biodisponibilidad sistémica, especialmente en humanos (Schauer *et al.*, 2006). Aun así, el TBBPA puede ejercer efectos muy rápidamente tras la exposición, causando alteraciones conductuales en exposiciones agudas (Nakajima *et al.*, 2009).

Por otro lado, el TBBPA puede sufrir procesos de degradación, formando derivados igual o más tóxicos. En condiciones anaerobias, el TBBPA presente en los sedimentos sufre procesos de desbromización generando varios intermediarios, destacando el bisfenol A; éste se degrada rápidamente en presencia de oxígeno, sin embargo, el resto de intermediarios y el propio TBBPA se vuelven persistentes en el medio (Wei *et al.*, 2018).

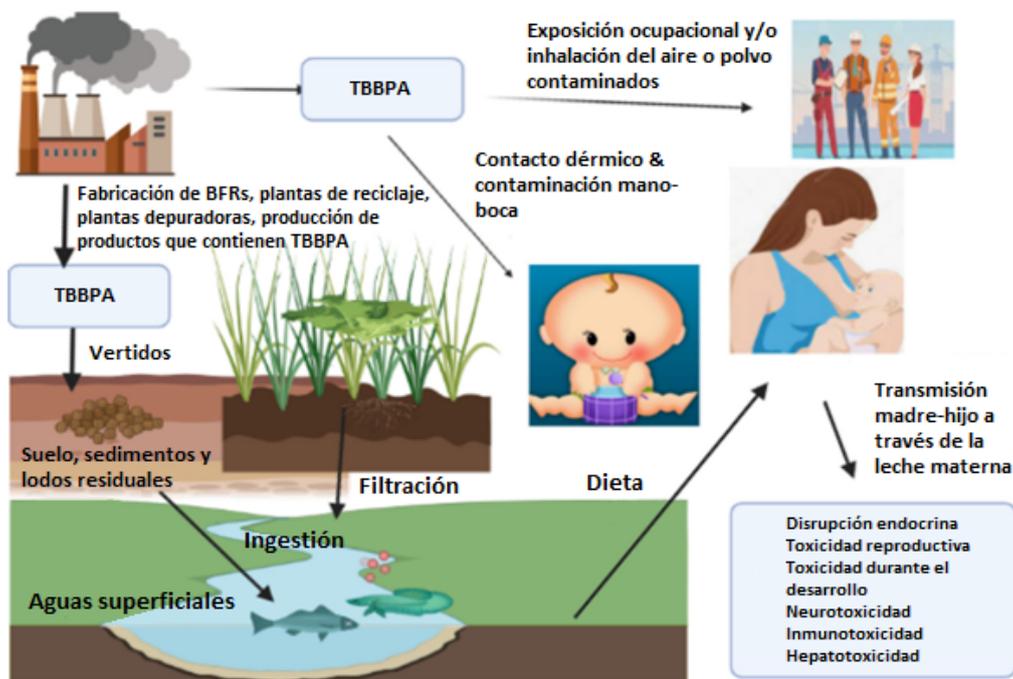


FIGURA 6. Principales fuentes y rutas de exposición del tetrabromobisfenol A (TBBPA). Modificado de Okeke *et al.*, 2022.

Plásticos

Los plásticos son polímeros sintéticos, por lo general derivados petroquímicos sintetizados a partir de combustibles fósiles (Sharma & Chatterjee, 2017), a los que se les añaden compuestos químicos que mejoran su rendimiento tales como bisfenoles, ftalatos y retardantes de llama, lo que les confieren propiedades únicas (Jiang *et al.*, 2020). Aunque puedan ser sintetizados a partir de diferentes fuentes (combustibles fósiles o recursos biológicos), una vez el polímero es sintetizado sus propiedades se mantienen independientemente del tipo de material que se usó en su síntesis (Rhodes, 2018).

Desde que se comenzó la fabricación a escala industrial de estos polímeros sintéticos en torno a 1940, la producción, consumo y generación de residuos plásticos ha aumentado de forma considerable; se estima que hasta el año 2017 se han producido 8.3 millones de toneladas métricas (Tm) de plásticos vírgenes (Geyer *et al.*, 2017). En 2015, se generaron aproximadamente 6.3 millones Tm de residuos plásticos de los cuales el 9% fue reciclado, el 12% incinerado y el 79% restante se acumuló en vertederos o en el medio ambiente. Si esta

tendencia de producción y gestión de residuos continúa, aproximadamente 12.000 Tm de residuos plásticos acabarán en vertederos o en el medio ambiente para 2050 (Geyer *et al.*, 2017). Debido a que estos materiales son duraderos y químicamente resistentes, se degradan lentamente, acumulándose en el medio.

Los plásticos se utilizan en una gran variedad de productos que usamos de forma cotidiana, como abonos, revestimientos y cableados, plásticos de embalaje, bolsas, contenedores y recipientes de alimentos, así como en fibras textiles debido a su bajo coste, rápida producción, versatilidad e hidrofobicidad (Al-Salem *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2020). Aunque se pueden catalogar teniendo en cuenta su estructura química, el tipo de método sintético empleado en su desarrollo (policondensación, entrecruzamiento, poliadición), o sus propiedades termomecánicas definitivas (dureza, resistencia a la tracción, resistencia al calor, temperatura de transición), fundamentalmente se clasifican en dos tipos diferentes (Rhodes, 2018):

- Termoplásticos: se pueden moldear repetidamente al ser calentados. En esta categoría se encuentran el polietileno (PE) –tanto de alta (HDPE) como de baja densidad (LDPE)–, el tereftalato de polietileno (PET), polipropileno (PP), policloruro de vinilo (PVC) y el poliestireno (PS).
- Plásticos termoestables: una vez polimerizados no pueden volver a ser calentados y remodelados. Ejemplos de este tipo de plásticos son el poliuretano (PUR) y las resinas o recubrimientos epoxi.

En los últimos 50 años ha habido multitud de cambios drásticos, pero uno de los más notables y destacados es la abundancia y ubicuidad de residuos plásticos. A pesar de ser un problema ampliamente reconocido, no se han tomado medidas al respecto y aunque se cesase la producción de inmediato, este problema seguiría estando presente durante varios siglos (Barnes *et al.*, 2009). Los residuos de plástico que se generan en mayor proporción son el tereftalato de polietileno (PET), polipropileno (PP), el polietileno de alta (HDPE) y baja densidad (LDPE) y el poliestireno (PS). Dependiendo del tipo de plástico y las condiciones medioambientales, se estima que se requieren entre 10 y 10.000 años para que se degraden de forma natural estos termoplásticos (Taghavi *et al.*, 2021).

Puesto que la gran mayoría de los monómeros empleados para fabricar plásticos derivan de combustibles fósiles, los plásticos de uso más común no son biodegradables (Geyer *et al.*, 2017). Sin embargo, aunque se suele considerar que los plásticos de origen biológico son biodegradables, pueden llegar a no serlo. Actualmente, casi la mitad de los plásticos de origen biológico disponibles no son biodegradables; esto es debido a que requieren de ciertas temperaturas y una presión específica que sólo se pueden dar en las plantas de compostaje, lo que hace por tanto que sean igual de peligrosos que los tradicionales. Algunos ejemplos son el bio-PE, el bio-PP o el bio-PET (Rahman & Bhoi, 2021).

Los plásticos, bajo condiciones ambientales normales, son capaces de experimentar procesos de degradación a través de cuatro mecanismos: fotodegradación, degradación termooxidativa, hidrólisis y degradación por la acción de microorganismos. El evento inicial consiste en la fotodegradación por exposición solar (radiación UV), lo que prepara el material para la subsiguiente degradación termooxidativa (incineración, pirólisis y gasificación). Como resultado el plástico se deteriora, pierde su resistencia a la tracción y se vuelve quebradizo, generando múltiples fragmentos de menor tamaño, denominados microplásticos y nanoplásticos en función de sus dimensiones (Andrady, 2011; Sivan, 2011; Rhodes, 2018; Taghavi *et al.*, 2021). Esta fragmentación física también hace que la masa molecular de los polímeros se vea modificada (Sivan, 2011). Finalmente, esta degradación alcanza el nivel molecular, siendo metabolizado por microorganismos, los cuales incorporan los átomos de carbono en nuevas biomoléculas o los oxidan a CO₂.

Puesto que estos procesos de degradación originan plásticos de diferentes tamaños, y aunque su clasificación no ha sido consensuada se suelen categorizar de la siguiente forma (Sharma & Chatterjee, 2017; Alimi *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2020):

- Nanoplásticos (NPs): aquellos con un tamaño comprendido entre 1 a 100 nm.
- Microplásticos (MPs): con un tamaño comprendido entre 0.1 a 5000 μm .
- Mesoplásticos: de tamaño comprendido entre 5-25 mm.
- Macroplásticos: con un tamaño superior a 25 mm.

Este proceso de degradación es muy lento, y por otro lado la limitada disponibilidad de oxígeno en los océanos, sumado a las bajas temperaturas, hacen que la velocidad de hidrólisis sea demasiado baja como para ser considerada una ruta efectiva para la degradación de la mayoría de los polímeros que componen los residuos plásticos (Andrady, 2011; Rhodes, 2018). En cuanto al plástico localizado en los vertederos, estos se disponen en terrenos que no son fértiles y en los que se dan fundamentalmente condiciones anaeróbicas (no proveyendo el oxígeno necesario para la degradación termooxidativa); estas condiciones hacen que los plásticos se acumulen en estas zonas (Rhodes, 2018).

El hecho de que la mayor parte de los plásticos no se dirigen a plantas de reciclaje hace que se acumulen en vertederos o que sean transportados desde su zona de origen a sumideros como el océano gracias a su flotabilidad (Hammer *et al.*, 2012), contaminando el medio y exponiendo a los organismos, especialmente a los del medio marino. Éstos pueden resultar heridos, por ejemplo, al enredarse en redes de pesca descartadas, equipos de pesca o en materiales de plástico destinados al embalaje, como anillas de plástico y bolsas. También pueden llegar a ingerirlos, especialmente aquellos de menor tamaño, lo cual puede causar varios problemas sobre su salud, tanto de forma directa por los propios materiales plásticos como por la liberación de compuestos químicos adheridos a estos: tal es el caso del bisfenol A o de los ftalatos, que llegan a provocar efectos deletéreos sobre los procesos fisiológicos tanto en animales como en humanos (Meeker *et al.*, 2009; Teuten *et al.*, 2009; Kühn *et al.*, 2015; Rhodes, 2018).

Además del potencial tóxico de los polímeros plásticos, su relación superficie/volumen es suficiente como para adsorber eficazmente los contaminantes hidrofóbicos del medio acuático y terrestre (Teuten *et al.*, 2009; Gautam & Anbumani, 2020). Adicionalmente, los plásticos que son ingeridos pueden bioacumularse y bioamplificarse en los organismos acuáticos, así como transferirse dentro de la red trófica (Nelms *et al.*, 2018; Zaki & Aris; 2022) por lo que pueden llegar a provocar efectos adversos en la salud humana.

Nanoplásticos (NPs)

Los nanoplásticos son diminutos fragmentos de plástico con un tamaño comprendido entre 1 – 100 nm en al menos dos dimensiones. Además de producirse por la fragmentación de fragmentos más grandes de plástico, también son producidos durante la fragmentación de fibras sintéticas durante el lavado de la ropa, el desgaste de los neumáticos de los automóviles y también están presentes en varios productos de cuidado personal como dentífricos, lociones, jabones y cremas faciales y corporales, tal y como se aprecia en la Fig. 7 (Carr *et al.*, 2016; da Costa *et al.*, 2016; Hernández *et al.*, 2017; Sharma & Chatterjee, 2017; Lai *et al.*, 2022). Por todo ello, estos nanoplásticos se pueden encontrar tanto en el suelo como acumulándose en medios acuáticos debido a su presencia en efluentes tratados y aguas residuales. Sin embargo, igual que lo que ocurre con los BFRs, los métodos convencionales de tratamiento de las aguas residuales no son capaces de eliminar estos NPs de forma efectiva (da Costa *et al.*, 2016; Iyare *et al.*, 2020; Mohana *et al.*, 2021). Adicionalmente, estas

partículas pueden ser transferidas a la atmósfera durante los procesos de desintegración de láminas de poliestireno usadas en la agricultura, durante el secado de la ropa o de lodos residuales contaminados empleados como fertilizante (da Costa *et al.*, 2016).

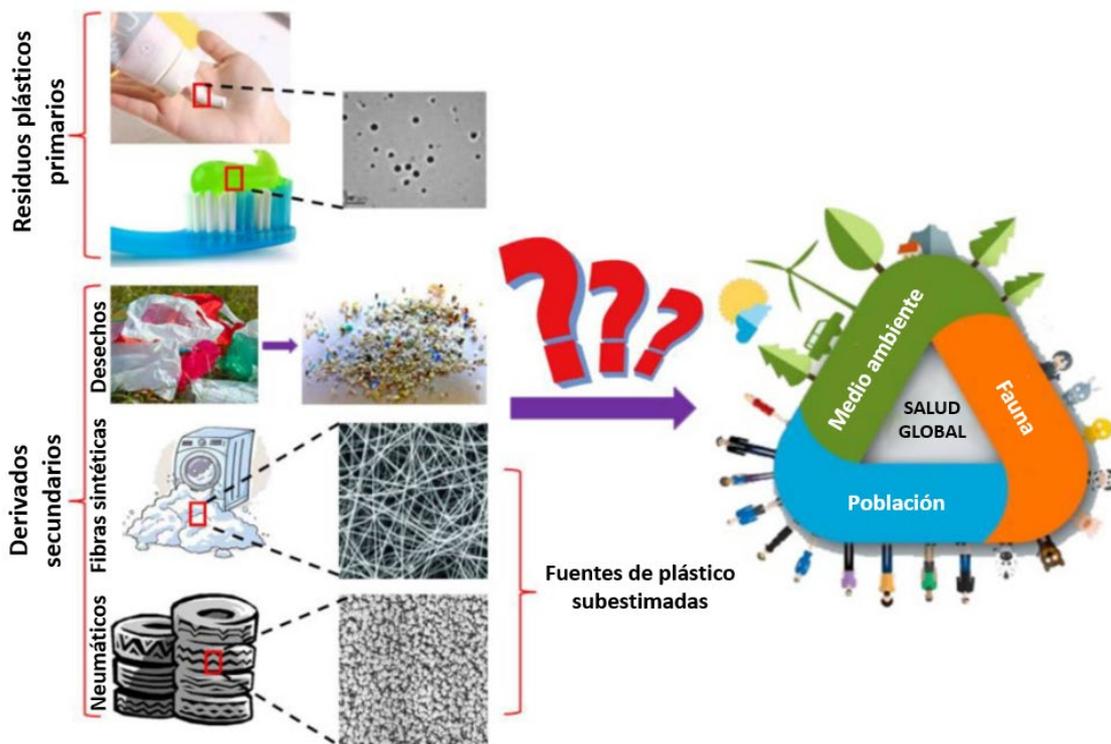


FIGURA 7. Principales fuentes de nanoplasticos en el medio ambiente. Modificado de Lai *et al.*, 2022.

Su tamaño reducido y su alta relación superficie/volumen hacen que sean ingeridos por diferentes organismos marinos como los corales, el fitoplancton y el zooplancton, los cuales son los principales consumidores de la cadena alimentaria (Sharma & Chatterjee, 2017), teniendo por tanto la capacidad de bioacumularse y bioamplificarse en los organismos acuáticos, transfiriéndose dentro de la propia red trófica (Nelms *et al.*, 2018; Zaki & Aris, 2022). Estas propiedades también permiten que los contaminantes orgánicos persistentes (COP) se adsorban en su superficie, lo que potencia sus posibles efectos perniciosos (Sharma & Chatterjee, 2017; Tallec *et al.*, 2019). Este hecho también se ve favorecido gracias a la formación de lo que se denomina “eco-corona”, la cual se forma cuando estos nanoplasticos se encuentran en medios biológicos complejos al ser rodeados de biomoléculas; favorece su dispersión y también puede alterar sus propiedades fisicoquímicas, interacciones, destino y efectos en el medio (Monopoli *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2022). Por otro lado, los nanoplasticos no pueden ser clasificados ni como microplásticos ni como nanopartículas diseñadas (ENMs): en cuanto a sus diferencias con respecto a los microplásticos, (además del tamaño), los nanoplasticos poseen diferentes propiedades de transporte, interacciones con la luz y los coloides, diferentes tiempos de difusión en los que se liberan los aditivos plásticos unidos a ellos, biodisponibilidad y una mayor fracción de partículas moleculares en su superficie. Por otro lado, en comparación con las ENMs, los nanoplasticos presentan una mayor heterogenicidad en el tamaño de las partículas y un mayor potencial de fragmentación en el medio ambiente (Gigault *et al.*, 2021).

Las principales formas de exposición a estos nanoplasticos son por vía oral –ingestión de agua y alimentos contaminados: se ha detectado la presencia de estos nanoplasticos en alimentos como el marisco, sal marina, azúcar, miel o cerveza (Hernández *et al.*, 2019; Vitali *et al.*, 2022); inhalación (material particulado PM 2,5 (Shi *et al.*, 2015)) y exposición dérmica (Lai *et al.*, 2022).

En cuanto a los potenciales efectos tóxicos que puedan representar estos nanoplásticos sobre la salud, lo cierto es que, aunque los estudios realizados hasta ahora sugieren que el impacto que pueden llegar a tener no es relevante, al menos a largo plazo (Yong *et al.*, 2020), sí que se han visto algunos efectos relacionados con el aumento de los niveles de estrés oxidativo (Bhattacharjee *et al.*, 2014), daños a la membrana plasmática (Fröhlich, 2012), translocación (Wang *et al.*, 2013; Walczak *et al.*, 2015; Reinholz *et al.*, 2018) y disrupción del sistema inmune (Forte *et al.*, 2016; Greven *et al.*, 2016; Stapleton, 2019; Prata *et al.*, 2020; Lai *et al.*, 2022). Estos efectos se han visto generalmente en presencia de nanoplásticos de pequeño tamaño, carga positiva, en altas dosis y con aditivos/contaminantes tóxicos adheridos en su superficie (Banerjee & Shelver, 2021).

Aun así, parece que el efecto de los nanoplásticos es más perjudicial para la fauna acuática, siendo capaces de reducir la supervivencia del zooplancton e incluso de atravesar la barrera hematoencefálica en peces, causando trastornos conductuales (Mattsson *et al.*, 2017). Son capaces de acumularse en diferentes zonas dependiendo del tamaño, ya que las partículas menores tienden a acumularse en los órganos internos, mientras que las de mayor tamaño lo hacen en el intestino, branquias y piel (Torres-Ruiz *et al.*, 2021). En modelos celulares *in vitro*, los potenciales efectos citotóxicos que puedan llegar a ejercer varían en función del tipo celular empleado, lo que muestra que algunos modelos pueden llegar a ser más sensibles que otros (Banerjee & Shelver, 2021).

A pesar de todo ello, el efecto que pueden llegar a tener estos nanoplásticos sobre la salud humana todavía es desconocido. Esto se debe a que a pesar de conocer algunos de los posibles efectos adversos que pueden ejercer, la influencia que tienen varios parámetros fisicoquímicos de estas partículas todavía debe determinarse en algunos tipos celulares. Por otro lado, este análisis debe realizarse empleando dosis que sean consistentes con las que se dan en el medio ambiente. Igualmente, el estudio de dosis elevadas puede estudiarse para determinar los efectos de la exposición ocupacional de estas partículas sobre la salud humana, como el caso de estudio realizado por Arnaud, *et al.* sobre las patologías causadas por la exposición al polvo de policloruro de vinilo (PVC); por otro lado, la mayoría de estudios se han realizado nanopartículas de poliestireno, lo que en cierto modo limita entender el efecto general de los plásticos en el medio ambiente (Arnaud *et al.*, 1978; Shen *et al.*, 2019; Banerjee & Shelver, 2021). También cabe destacar que, muchas veces debido a la falta de consenso en la definición de “nanoplástico”, los efectos ejercidos por los microplásticos son comúnmente asociados a estas partículas en la bibliografía; esto no es correcto, puesto que poseen una serie de características fisicoquímicas que les hacen diferenciarse entre sí tal y como describen Gigault *et al.*, 2021 y, por lo tanto, deben estudiarse como entidades diferentes.

HIPÓTESIS

La hipótesis de partida de esta tesis es que la combinación del TBBPA con los PSNPs ejerce efectos a nivel celular significativamente diferentes con respecto a ambos compuestos por separado. Dichos efectos deberían ser similares independientemente del modelo experimental utilizado.

OBJETIVOS

El objetivo global de esta tesis consiste en caracterizar el perfil toxicológico de combinaciones TBBPA-PSNPs y compararlo con los de los compuestos por separado, evaluando la citotoxicidad basal y las alteraciones sobre las principales vías de respuesta a estrés en distintos modelos celulares.

Los objetivos concretos son los siguientes:

- Evaluar la citotoxicidad basal del TBBPA, los PSNPs y sus mezclas en líneas celulares de peces e intestinales humanas, determinando su perfil toxicológico tras exposición aguda.
- Determinar la potencial inducción de rutas de estrés oxidativo y de daño al ADN tras estas exposiciones agudas.
- Evaluar la citotoxicidad basal del TBBPA, los PSNPs y sus mezclas en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX, determinando su perfil toxicológico tras la exposición prolongada durante el proceso de diferenciación celular (21 días).
- Valorar los efectos de los compuestos sobre las rutas de estrés celular en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX tras la exposición durante el proceso de diferenciación celular.
- Analizar la influencia de las diferentes mezclas seleccionadas de TBBPA-PSNPs sobre la integridad de la barrera intestinal una vez concluido el proceso de diferenciación celular.



MATERIAL Y
MÉTODOS

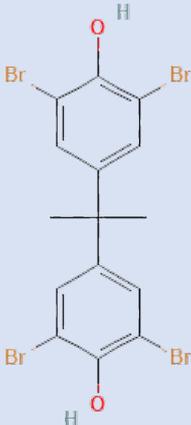


1. Compuestos de estudio

Los compuestos sometidos a estudio se corresponden con 3,3',5,5'-Tetrabromobisfenol A (TBBPA) (Sigma, Cat. Nº 330396) y con nanopartículas de poliestireno (PSNPs) carboxiladas de 0,04 μm (Fisher Scientific Spain, Cat. Nº 11590066). Para los estudios de morfología celular empleando microscopía confocal, se utilizaron PSNPs con las mismas características, pero marcados fluorescentemente (amarillo-verde, 505_{ex}/515_{em} nm) (Invitrogen, Cat. Nº F8795).

El TBBPA es un retardante de llama que contiene átomos de bromo en su estructura que le confieren propiedades ignífugas, cuyo uso se encuentra muy extendido y al que nos vemos expuesto de forma habitual en nuestro día a día (Zhou *et al.*, 2020). Las principales características fisicoquímicas de este compuesto se detallan en la tabla siguiente (Tabla 4):

TABLA 4. Características fisicoquímicas del compuesto de estudio TBBPA.

TBBPA	
	
Fórmula molecular	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{Br}_4\text{O}_2$
Nº CAS	79-94-7
Peso molecular	543,9
Solubilidad en agua	0,063 – 4,16 mg/L
log K_{ow}	4,75
pKa	9,40

Debido a las propiedades lipofílicas del TBBPA, éste se diluye en dimetil sulfóxido (DMSO) (SERVA, Cat. Nº 20385) a una concentración final de 0,1 M, a partir de la cual se realizarán las diluciones empleadas en los diferentes experimentos. Esta solución stock se mantiene a -20° C en oscuridad hasta su posterior uso.

En cuanto a los nanoplasticos, se encuentran modificados para incluir grupos carboxilo en su superficie, pudiendo poseer carga iónica bajo ciertas condiciones.

Los PSNPs comerciales se encuentran en una solución acuosa al 4 % p/v (40 mg/mL); para su uso se diluyen en agua MiliQ para generar una dispersión stock de 10 mg/mL. A partir de ella, se elaboran las suspensiones de trabajo en los diferentes medios de cultivo, previa sonicación en un baño ultrasónico (al que se le añaden bloques de hielo que evitan el incremento de la temperatura) durante 30 min. En el caso de los PSNPs fluorescentes, estos se encuentran en una solución acuosa al 5 % p/v (50 mg/mL), y se usaron directamente para la realización de las diferentes suspensiones en medio de cultivo, previa sonicación en baño ultrasónico durante 30 min.

1.1. Caracterización de los PSNPs

Para comprender mejor el comportamiento y la dinámica de estas nanopartículas se ha realizado la caracterización de éstas mediante DLS (Dynamic light scattering), una técnica físico química empleada para determinar el tamaño y la distribución del tamaño de estas partículas, en un aparato Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). En cuanto al potencial Z, las medidas se realizaron a 25° C empleando dispersión de luz electroforética (ELS) en el mismo instrumento. Dicha caracterización se realizó en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá, bajo la supervisión del Dr. Roberto Rosal. De esta manera podemos inferir el estado de las partículas en suspensión, una vez sonicada, tanto en la solución stock de partida como una vez disuelta en los correspondientes medios de cultivo.

El potencial Z es una propiedad física que permite medir la magnitud de atracción o repulsión de carga entre las partículas presentes en una solución. Es bien sabido que los nanoplásticos tienden a agregar al encontrarse en suspensión (Jiang *et al.*, 2009); esto se debe a la formación de una doble capa eléctrica compuesta por los iones presentes en el medio líquido, que se ve favorecida por la presencia de carga en la superficie de las partículas y es lo que hace que posean la capacidad de estabilizarse eléctricamente (Hunter, 2013). Cuando las partículas poseen un elevado potencial Z, tanto positivo como negativo, se da una elevada fuerza de repulsión electrostática entre ellas, lo que evita que se aproximen entre sí y formen agregados. Es por ello por lo que, cuanto más próximo a cero se encuentre este potencial Z menor es esta fuerza de repulsión, haciendo que sea más probable que las partículas agreguen entre sí. Por todo esto, el potencial Z proporciona una buena medida de la predicción de la estabilidad y, por lo tanto, de la calidad de la dispersión (Freitas & Müller, 1998; Shah *et al.*, 2014).

De forma complementaria, se ha analizado la dispersión de estos PSNPs mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) para corroborar sus características. Dichos estudios se realizaron en el servicio de microscopía electrónica del CBMSO (CSIC), empleando un microscopio JEM1400 Flash (Jeol, Tokyo, Japón) equipado con una cámara CMOS Oneview (Gatan, Pleasantville, EE. UU.). Para ello, se coloca sobre una rejilla con revestimiento de carbono una gota de las diferentes suspensiones (tanto la solución stock como las disueltas en los medios de cultivo correspondientes), se hacen una serie de lavados sucesivos para retirar el exceso y se dejan secar. De esta forma, las nanopartículas adheridas a la rejilla se observan directamente sobre la misma en el MET.

2. Líneas celulares

Para la determinación del impacto toxicológico de los compuestos TBBPA y PSNPs, tanto por separado como en combinación, se han empleado distintas líneas celulares pertenecientes a diferentes tipos de organismos.

Por una parte, se han empleado líneas celulares procedentes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Concretamente la línea celular RTgill-W1, generada a partir de un cultivo primario de fragmentos branquiales



(ATCC, CRL-2523); la línea celular RTgutGC, generada a partir de células intestinales y por último la línea celular RTL-W1 a partir de células hepáticas. Estas dos últimas líneas celulares fueron cedidas por la Dra. Kristin Schirmer (Eawag, Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology).

Estas células se cultivan en medio Leibovitz's L-15 con piruvato sódico y sin rojo fenol (Gibco, Life Technologies Corporation, New York, EE. UU., Cat. Nº 21083027) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (Gibco, Cat. Nº A3160401) y antibiótico penicilina/estreptomina al 1% (Gibco, Cat. Nº 15070063) e incubadas a 20° C en atmosfera sin CO₂. El subcultivo de estas células se realiza de forma general una vez a la semana, antes de alcanzar la confluencia, con cambio de medio 2 veces por semana.

Por otro lado, se han empleado células de mamífero correspondientes a la línea celular Caco-2 (ATCC, HTB-37), consistentes en una línea epitelial de adenocarcinoma de colon humano. Esta línea tiene la capacidad de diferenciarse espontáneamente al alcanzar la confluencia, adquiriendo características similares a las presentes *in vivo* en el intestino delgado (Pinto *et al.* 1983; Hidalgo *et al.*, 1989). Este proceso de diferenciación se completa tras el transcurso de 21 días tras alcanzar la confluencia (Natoli *et al.*, 2011), que suele darse tras el tercer día tras la siembra (Leoni *et al.*, 2012).

También se han empleado la línea celular HT29-MTX (ECACC, 15121711), con el mismo origen que Caco-2 pero diferenciándose de ésta al encontrarse especializada en la secreción de mucus gracias a su resistencia al metotrexato (MTX), característica que le permite diferenciarse en células caliciformes maduras (Lesuffleur *et al.*, 1990).

Las líneas celulares Caco-2 y HT29-MTX se cultivan en medio DMEM con alto contenido en glucosa y piruvato sódico (HyClone Laboratories, GE Healthcare Life Sciences, Utah, EE. UU., Cat. Nº SH30243.01), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, aminoácidos no esenciales MEM (Gibco, Cat. Nº 11140050) y antibiótico penicilina/estreptomina (ambos al 1%) e incubadas a 37° C en atmósfera al 5% de CO₂.

El subcultivo de estas células se realiza generalmente cuando alcanzan un 70-80% de confluencia (siendo esto especialmente importante en el caso de las Caco-2 para evitar que se diferencien prematuramente), con cambio de medio cada 2-3 días.

3. Diseño experimental

El planteamiento de un diseño experimental adecuado es esencial. Éste depende tanto de los objetivos del experimento, como del número de variables a investigar (Fig. 8) (Hanrahan *et al.*, 2005).

Para determinar las características toxicológicas de los compuestos de estudio del presente trabajo, se ha planteado una aproximación metodológica *in vitro* por la cual se evalúan empleando una batería de ensayos cuyo objetivo último consiste en valorar sus principales dianas de toxicidad e influencia sobre el metabolismo celular, tanto en células de mamífero como de peces en cultivo.

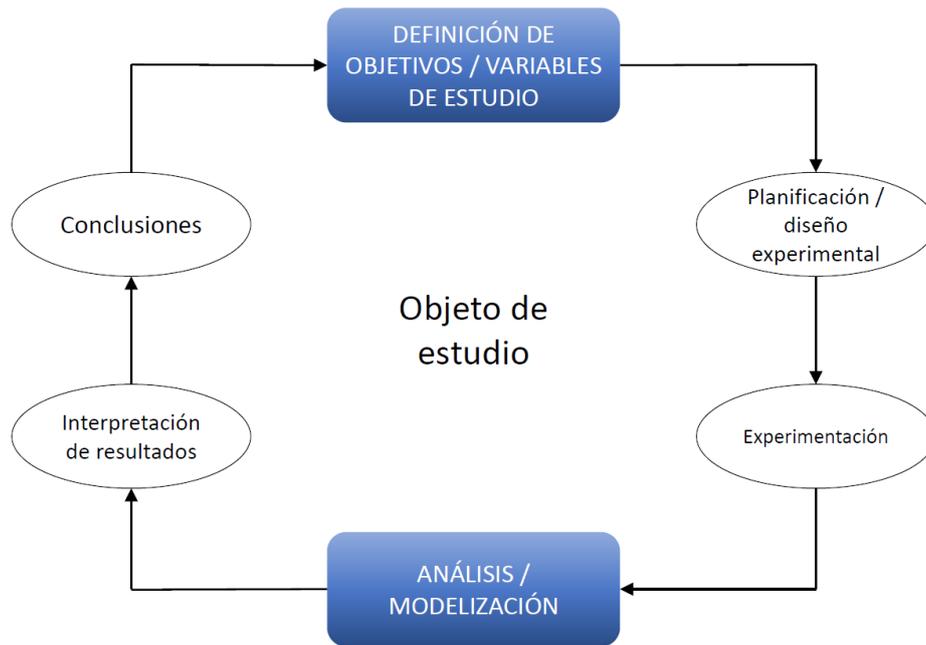


FIGURA 8. Criterios esenciales durante la planificación experimental. Modificado de Hanrahan *et al.*, 2005.

Para ello, se procede en primera instancia con la determinación de la citotoxicidad basal en las líneas celulares anteriormente mencionadas. Mediante este primer acercamiento, podemos definir y ajustar un rango de citotoxicidad que sirva como base para poder determinar las condiciones más relevantes para los subsiguientes ensayos, permitiendo así la caracterización del perfil toxicológico de los compuestos. Este tipo de aproximaciones agudas tienen un tiempo de exposición de 24 h y se definen como “aquellos efectos adversos resultado de la interferencia con estructuras y/o procesos esenciales para la supervivencia, proliferación y/o función común de todas las células de un organismo” (Ekwall, 1995).

Se ha comprobado además una aparente similitud en las respuestas citotóxicas ejercidas por una gran variedad de compuestos químicos sobre líneas celulares de peces y de mamíferos a 24 h (Castaño & Gómez-Lechón, 2005), por lo que este tipo de ensayos de toxicidad aguda pueden resultar efectivos para comparar los posibles efectos ejercidos por los compuestos seleccionados en el presente trabajo para llevar a cabo las determinaciones en ambos tipos de líneas celulares.

Una vez estudiadas y seleccionadas aquellas condiciones de exposición más relevantes gracias a la evaluación de los resultados obtenidos con la citotoxicidad basal, se procede con una serie de aproximaciones más claramente definidas empleando una serie de ensayos específicos, que permitan indagar de forma más concreta las posibles dianas y mecanismos de acción de los compuestos sobre los diferentes tipos celulares.

Debido a que la línea celular Caco-2 posee la capacidad de diferenciarse espontáneamente, también se han evaluado los posibles efectos citotóxicos del TBBPA y los PSNPs durante este proceso de diferenciación, realizándose para ello un estudio toxicológico en tiempos de exposición más prolongados, manteniéndose durante los 21 días que requiere dicho proceso. Este tipo de exposición nos permite evaluar la posible existencia de concentraciones de compuesto que puedan llegar a ser citotóxicas y que dependan de la administración repetida de los mismos.

Esta aproximación nos puede resultar útil para, en conjunto con los datos ofrecidos por los ensayos de toxicidad aguda, seleccionar y determinar las concentraciones de compuestos óptimas para evidenciar las

posibles diferencias que existan entre sus efectos por separado frente a los ejercidos en combinación, siendo éste el objetivo principal de esta tesis.

3.1. Toxicidad aguda

Las células crecidas y mantenidas en frascos de 75 cm² se sembraron en placas de 96 pocillos para llevar a cabo las diferentes aproximaciones experimentales para la determinación de la citotoxicidad aguda.

Para la determinación de la citotoxicidad en las células de peces, cada una de estas líneas celulares se sembraron a una densidad de 2×10^5 cel/mL y se dejaron incubando hasta que alcanzan la confluencia adecuada. Las exposiciones a los distintos compuestos se realizaron en medio con suero reducido al 2% (v/v) durante su periodo de crecimiento exponencial y se mantuvo la exposición durante 24 h, tras las cuales se procesaron de acuerdo con los diferentes requerimientos de estudio.

En el caso de las células de mamífero, se realizó la siembra a diferentes densidades dependiendo del tipo celular, a saber: Caco-2 (2×10^5 cel/mL) y HT29-MTX ($1,5 \times 10^5$ cel/mL). Para los ensayos con el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX, se sembraron 2×10^5 cel/mL manteniendo una ratio (9:1). Tras la siembra se dejan incubando 24 h, tras las cuales se procede a tratar las células (en fase de crecimiento exponencial) con los diferentes compuestos en medio DMEM con suero al 10% (v/v) otras 24 h, siguiendo con su posterior procesamiento. La Fig. 9 esquematiza el procedimiento realizado para llevar a cabo estas determinaciones.

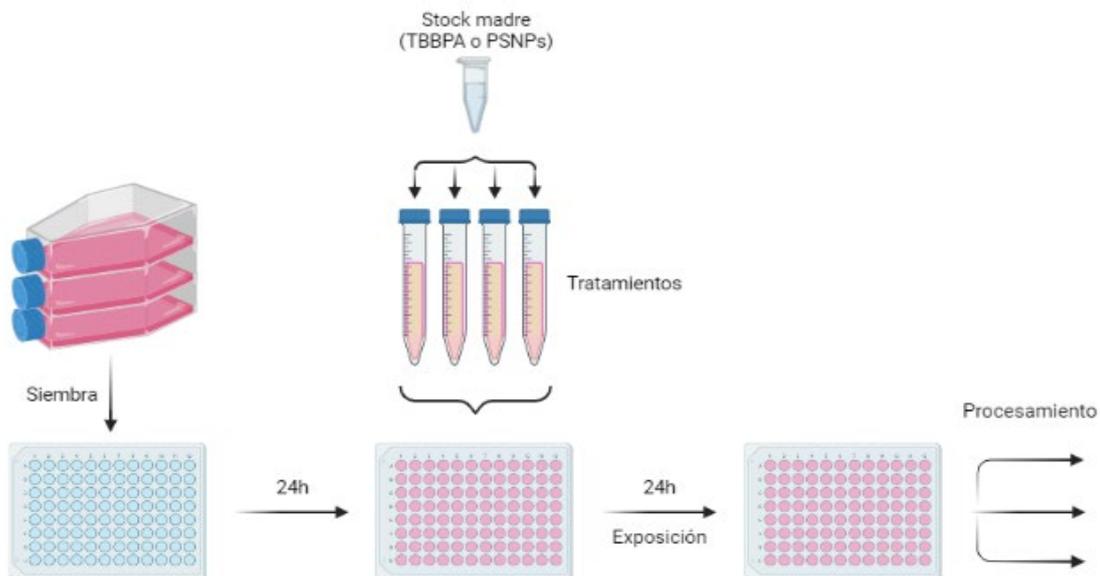


FIGURA 9. Diseño experimental para la determinación de la toxicidad aguda. Tras la siembra, las células permanecieron expuestas a los compuestos de estudio durante 24 h, tras las cuales, se procesaron de acuerdo con lo dispuesto para los diferentes procedimientos experimentales. Creado con BioRender.com

3.2. Toxicidad prolongada

Las células Caco-2 poseen la capacidad para diferenciarse espontáneamente transcurridos 21 d desde el momento que alcanzan la confluencia tras la siembra. Para la determinación del potencial citotóxico de los compuestos de estudios en estas células, tanto de forma independiente como al encontrarse en co-cultivo con las células HT29-MTX, se emplea la misma metodología usada para la determinación de la citotoxicidad aguda, con la diferencia de que en este caso se mantiene la exposición de los compuestos durante los 21 d que dura este proceso de diferenciación, realizándose el cambio de medio cada 2-3 días (Fig. 10). Una vez

finalizados estos 21 d, se procede a la determinación de la viabilidad celular siguiendo con los procedimientos experimentales que se detallan más adelante.

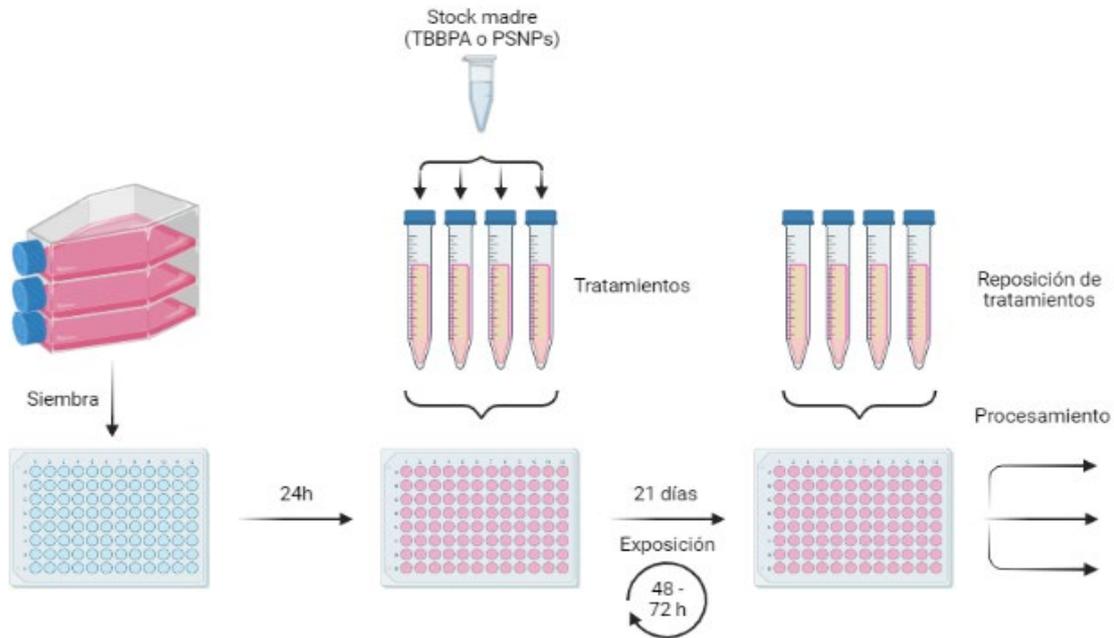


FIGURA 10. Diseño experimental para la determinación de la toxicidad por exposición prolongada. En esta aproximación, tanto las células Caco-2 como el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX permanecieron expuestas a los compuestos de estudio durante 21 d, reponiéndolos pasadas 48 o 72 h. Finalizados estos 21 d de tratamiento, las células se procesaron de acuerdo con los diferentes procedimientos experimentales. Creado con BioRender.com

4. Ensayos de citotoxicidad

En cuanto a la determinación de la citotoxicidad de los compuestos, se emplea una batería de técnicas complementarias entre sí que permiten la valoración de la integridad y viabilidad celular a diferentes niveles. Estas consisten en determinar la actividad metabólica mediante el ensayo fluorimétrico Alamar Blue (AB), el cual se combina con el ensayo de la carboxifluoresceína diacetato acetoximetil ester (CFDA-AM), que determina la integridad de la membrana plasmática. Estos dos colorantes pueden ser evaluados de forma simultánea, ya que no se producen interferencias durante las medidas de fluorescencia de ambos compuestos (Schirmer *et al.*, 1997; Schreer *et al.*, 2005).

El Alamar Blue es un indicador de la actividad metabólica celular; se basa en el compuesto activo resazurina, un colorante azul no fluorescente que es reducido a resorufina, de color rosáceo y altamente fluorescente. Las ventajas que posee la resazurina frente a otros ensayos basados en la formación de sales de tetrazolio son el hecho de ser soluble en agua y estable en medio de cultivo. Adicionalmente, es un compuesto no tóxico y capaz de atravesar las membranas celulares. Este colorante actúa como un aceptor de electrones intermediario en la cadena de transporte de electrones sin perjudicar la transferencia de electrones de ésta (Rampersad, 2012). Se han descrito varios mecanismos en los que la resazurina es reducida por las células viables y en los que se usan el NADH y el NADPH como fuente de electrones: entre estos, se incluyen la reducción por enzimas mitocondriales o microsomales, enzimas presentes en la cadena respiratoria o agentes aceptores de electrones (Präbst *et al.*, 2017). Cuando el colorante acepta dichos electrones cambia de su estado oxidado y no fluorescente (resazurina-azul), a su estado reducido y fluorescente (resorufina-rosa). Por



todo ello, la reducción del Alamar Blue puede indicar deficiencias en el metabolismo celular y no necesariamente la interrupción específica de la cadena de transporte de electrones y disfunción mitocondrial.

Para la determinación de la integridad de la membrana plasmática, se emplea el colorante CFDA-AM. Este colorante es un sustrato no tóxico para las esterasas intracelulares no específicas de las células viables, pasando de ser un colorante no polar (por tanto, con la capacidad de atravesar las membranas celulares) y no fluorescente, a un colorante fluorescente y polar, la carboxifluoresceína (CF). La conversión a CF por las células indica la integridad de la membrana plasmática, puesto que sólo una membrana celular intacta puede mantener el microambiente citoplasmático necesario para la actividad de las esterasas intracelulares (Ganassin *et al.*, 2000).

Por último, se procede con la determinación de la integridad de las membranas lisosomales mediante el colorante rojo neutro (RN); éste se basa en la habilidad que tienen las células viables de incorporar y unir el colorante supravital rojo neutro en los lisosomas. Este colorante débilmente catiónico penetra en las células mediante mecanismos de difusión pasiva no iónica y se concentra en los lisosomas, concretamente en la matriz lisosomal, mediante la formación de enlaces hidrófobos electrostáticos con los grupos fosfato y/o aniónicos presentes en la misma. A pH fisiológico el colorante presenta una carga neta próxima a cero, permitiéndole atravesar las membranas celulares; en el interior de los lisosomas, sin embargo, se da un gradiente de protones que mantienen un nivel de pH inferior al que se localiza en el citoplasma, lo que provoca que el colorante adquiera una carga diferencial que le permite localizarse en el interior de estos lisosomas. De esta forma, si las células poseen intacta la capacidad de mantener los gradientes de pH a través de la producción de ATP, este colorante puede ser extraído usando una solución de etanol acidificada y, por tanto, la absorbancia del colorante solubilizado puede ser cuantificada mediante el uso de un espectrofotómetro (Repetto *et al.*, 2008).

Para llevar a cabo estas evaluaciones, inicialmente se prepara la solución stock de CFDA-AM (Invitrogen, Cat. Nº C1354) disolviéndose en DMSO a una concentración final de 4 mM y manteniéndose a -20° C en oscuridad hasta su uso. La solución Alamar blue (Invitrogen, Cat. Nº DAL1100) se encuentra preparada lista para su uso y se mantiene a 4° C. En el caso del rojo neutro (RN), se prepara una solución stock a 4 mg/mL en agua MiliQ y se almacena a 4° C. Debido a que el RN se internaliza en los lisosomas se realiza, previo paso de lavado con una solución consistente en un 1% (p/v) de cloruro de calcio (CaCl₂) junto con un 1% (v/v) de formaldehído al 37% en agua destilada (H₂O_d), una extracción del colorante de las células tratadas. Para ello, se emplea una solución de extracción (1% (v/v) de ácido acético glacial y 50% (v/v) de etanol absoluto en H₂O_d) y posterior sonicación de las células para poder realizar las pertinentes medidas de fluorescencia.

Tras la finalización de la exposición de los compuestos sobre las células tal y como se ha descrito en el apartado de diseño experimental, y previo lavado con PBS 1x (Gibco, Cat. Nº 14190-094), se añaden 100 µL por pocillo de una mezcla de Alamar blue 5% (v/v) y 4 µM de CFDA-AM disueltos en medio DMEM libre de suero y sin rojo fenol, dejándose incubar durante 30 min, tras los cuales se procede a medir la fluorescencia en los rangos de excitación/emisión correspondientes (530/595 nm para el AB, y 485/530 nm en el caso de la CFDA-AM) en un lector de placas Synergy HT (Biotek, Vermont, EE. UU.). Una vez hecho esto, se procede a retirar la solución y añadir en su lugar 100 µL/pocillo de una disolución 40 µg/mL de RN en medio DMEM sin rojo fenol, dejando incubar durante 1 h. Esta disolución se suele preparar en condiciones normales el día de antes, manteniéndose a 37° C y filtrándola con un filtro de 0,22 µm para eliminar los posibles precipitados que se formen. Finalizado el tiempo de incubación, se procede a descartar la disolución de RN y realizar previamente un lavado con la solución de lavado (mencionada anteriormente) para finalmente añadir 100 µL de solución de extracción por pocillo, llevándose la placa al baño ultrasónico y empleando 3-5 pulsos de 2-3

s. Tras ello, se mantiene la placa en agitación durante 10 min y se procede a medir la fluorescencia en los rangos de excitación/emisión correspondientes a 530/645 nm.

Como se puede observar, estas tres evaluaciones se desarrollan sobre la misma placa de ensayo de forma secuencial, lo que permite determinar los tres parámetros de citotoxicidad sobre la misma placa, reduciendo la variabilidad y obteniendo varias réplicas fiables al encontrarse todas las células bajo las mismas condiciones, permitiendo así un elevado grado de optimización.

Mediante estos ensayos se evalúa la citotoxicidad basal tanto del compuesto TBBPA como de los PSNPs, inicialmente por separado. De esta forma, se procede con la evaluación de un rango amplio de concentraciones, abarcando en el caso del TBBPA el rango comprendido desde 1 - 150 μM y en el caso de los PSNPs desde 1 - 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Debido a que el TBBPA se encuentra disuelto en DMSO, siendo este último tóxico *per se* para las células y para evitar de esta forma que la viabilidad celular se vea comprometida por dicho compuesto, la concentración máxima de DMSO empleada en los diferentes experimentos es la equivalente al 0,1%. Esta concentración máxima es la que se correlaciona con la máxima concentración empleada para los ensayos de citotoxicidad, correspondiente a la disolución 150 μM de TBBPA. Con ello se asegura así que los posibles efectos citotóxicos observables correspondan únicamente al TBBPA y no sean por el contrario los ejercidos por el DMSO.

Una vez realizados los ensayos de citotoxicidad basal y seleccionado así las concentraciones subcitotóxicas relevantes tras determinar el EC_{50} (concentración requerida del compuesto en la cual se produce un 50% del efecto máximo producido por éste), se procede a evaluar la citotoxicidad del TBBPA y los PSNPs en diferentes combinaciones, lo cual a su vez permitirá seleccionar aquellas combinaciones cuyo perfil citotóxico permita discernir si la combinación de ambos compuestos altera la citotoxicidad que ejercen por separado. También se calcularon las *Benchmark Dose Responses* (BDRs) para los compuestos de estudio, así como en combinación, para cada una de las líneas celulares estudiadas.

5. Evaluación del estrés oxidativo

Para la evaluación cuantitativa de los niveles de estrés celular se han realizado diferentes aproximaciones. Estas aproximaciones se han realizado tras realizar la siembra en placas negras de 96 pocillos.

Para determinar la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), se emplea la sonda 2', 7' - diclorofluoresceína diacetato (H_2DCFDA). Este compuesto no fluorescente es hidrolizado por las esterasas presentes en la célula, lo que hace que quede retenido en el interior de ésta y sea rápidamente oxidada al altamente fluorescente DCF al entrar en contacto con H_2O_2 y otras ROS intracelulares, permitiendo así determinar cuantitativamente los niveles de estrés oxidativo que producen los compuestos estudiados en el interior celular (Eruslanov & Kusmartsev, 2010).

Partiendo de una disolución 50 mM de H_2DCFDA diluida en DMSO, se realiza una pre-incubación de las células con este compuesto, previo lavado con PBS 1x para eliminar los restos de suero que puedan interferir con la sonda, ya que se dan esterasas que pueden escindir de forma prematura la H_2DCFDA .

La concentración y el tiempo de incubación de este compuesto varían dependiendo del tipo celular empleado y debe ser evaluado de forma empírica (Joshi & Bakowska, 2011). Así pues, para este ensayo se han empleado las siguientes concentraciones y tiempos de incubación con los siguientes tipos celulares: RTgill-W1 (5 μM / 40 min) y Caco-2/HT29-MTX (15 μM / 50 min). Esta incubación se realiza diluyendo la disolución stock de H_2DCFDA en DMEM libre de suero y sin rojo fenol hasta la concentración requerida; de forma adicional, se



requiere que se use inmediatamente después de preparar la correspondiente dilución, ya que la H₂DCFDA es inestable y puede dar lugar a posteriores medidas erróneas.

Tras la incubación, se realizan 3 lavados con PBS 1x y a continuación se añaden los tratamientos deseados. Para la determinación se realizan medidas a diferentes tiempos hasta un máximo de 24 h, monitorizando la placa en un lector de placas Synergy HT con los filtros de excitación/emisión correspondientes a 480/530 nm.

6. Determinación del potencial de la membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi$)

El estado de integridad mitocondrial se determina mediante el uso del colorante tetrametilrodamina metil éster (TMRM) (Invitrogen, Cat. Nº T668), el cual se incorpora en la matriz mitocondrial de forma proporcional al potencial de la membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi$).

Las mitocondrias mantienen una diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior de este orgánulo; esto es lo que se denomina potencial de membrana. El TMRM penetra en las células y se acumula en las mitocondrias cuyo potencial de membrana esté intacto, emitiendo señal, sin embargo, si una mitocondria se ve comprometida, la membrana mitocondrial se despolariza y por lo tanto el TMRM deja de acumularse haciendo que la señal se atenúe o desaparezca (Wallberg *et al.*, 2016; Joshi & Bakowska, 2011).

Al igual que en la valoración del estrés oxidativo, las células se siembran sobre placas negras de 96 pocillos. Para la preparación de la solución stock, el contenido del vial se disuelve en 5 mL de DMSO, quedando a una concentración final de 10 mM; a partir de esta se realiza una segunda dilución stock final 100 μ M, almacenándose ambas a -20° C en oscuridad. Para la realización del ensayo, se genera una dilución en DMEM libre de suero y sin rojo fenol a una concentración final de 200 nM. Como control positivo para este ensayo, se emplea una concentración 50 μ M de cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona (CCCP) (Sigma-Aldrich, Cat. Nº C2759), el cual provoca la despolarización de la membrana mitocondrial.

Como se ha explicado anteriormente con la H₂DCFDA, la concentración y el tiempo de incubación de este compuesto varía en función del tipo celular y debe ser determinado de forma empírica (Joshi & Bakowska, 2011). Así pues, tras la exposición a los tratamientos seleccionados y previo lavado con PBS 1x, se añaden 200 μ L por pocillo de la solución 200 nM de TMRM y se deja incubar 30 min (exceptuando el caso del co-cultivo Caco-2/HT29-MTX, en el cual el tiempo de incubación es de 50 min). Transcurrido este tiempo, se procede a realizar 3 lavados con PBS 1x para posteriormente medir la fluorescencia mediante un lector de placas Synergy HT con filtros de 530 nm excitación/ 590 nm emisión.

7. Interferencia del TBBPA y los PSNPs

Para determinar si tanto el TBBPA como los PSNPs pueden interferir con los colorantes utilizados en los ensayos anteriores (siendo estos AB, CFDA, H₂CFDA y TMRM), se emplearon pocillos blanco como control (sin células), en los que se añadieron las diferentes concentraciones de compuestos químicos de estudio, tanto de forma individual como en combinación, empleadas en los diferentes ensayos.

En el caso de haber diferencias con respecto a los pocillos blanco sin tratar, se sustrajo la diferencia de estos pocillos blanco a aquellos pocillos tratados en presencia de células, bajo las mismas condiciones, en una misma placa de ensayo.

Todas las medidas de fluorescencia se realizaron usando un lector de placas Synergy HT dentro de los rangos específicos de cada colorante.

8. Evaluación de la genotoxicidad: ensayo Cometa

El daño potencial al ADN se determina mediante el ensayo Cometa en su versión alcalina normal y modificado con un tratamiento enzimático en el cual se emplea la enzima de reparación del daño oxidativo FPG (formamidopirimidina-ADN glicosilasa), de origen bacteriano. El ensayo Cometa permite detectar roturas en el ADN, tanto a nivel de doble cadena como simple (Azqueta & Collins, 2013); con esta modificación se pueden detectar los daños producidos por oxidación, en concreto de aquellos en los que el producto resultante consiste en 8-oxo-7,8-dihidroguanina. Esta enzima reconoce a esta base púrica oxidada, eliminándola de la hebra afectada y generando un sitio apurínico, lo que hace que se puedan detectar posibles efectos de daño oxidativo al ADN como si de una rotura inducida por daño genotóxico se tratase (Azqueta *et al.*, 2013).

Tras la siembra en placas de 6 pocillos y posterior tratamiento con los compuestos de estudio de las células, tanto a 24 h como durante 21 d en el caso del co-cultivo Caco-2/HT29-MTX, las células se tripsinizaron con Tripsina/EDTA 0,25% (Gibco, Cat. Nº 25200-072). Como control positivo para el daño oxidativo se utilizó el bromato de potasio (KBrO₃) (Merck, Cat. Nº 1.04912), el cual se añadió en una concentración de 500 µM mientras que para el daño genotóxico se empleó H₂O₂. Posteriormente, se realizan dos lavados sucesivos con PBS 1x frío, con sendas centrifugaciones a 1200 rpm durante 7 min y se procede a realizar el conteo celular, tras el cual, los pellets se resuspendieron a una densidad de 2 x 10⁶ células en tampón de congelación (85,5 g/L de sacarosa (Panreac, Cat. Nº 131621.1211), 50 mL/L de DMSO y 11,76 g/L de Na₃C₃H₅O (COO)₃ (Merck, 6448) disueltos en agua MiliQ y ajustado a pH 7,6 con tampón citrato) y se almacenaron a -80° C hasta su uso.

Para la preparación de los geles, las células se embeben a una concentración estimada de 10⁵ células en agarosa de bajo punto de fusión (LMA) (Sigma-Aldrich, Cat. Nº A9414) al 0,7%, y depositadas de forma que se produzcan 2 mini-geles sobre un portaobjetos que ha sido previamente revestido con agarosa al 1% (Sigma-Aldrich, Cat. Nº A9539). Para cada condición se hacen 3 portaobjetos, obteniendo así 6 réplicas para cada una de ellas.

Tras la solidificación de la agarosa, colocando los portaobjetos sobre una cama de hielo durante 10 min, las muestras se incubaron 1 h en oscuridad a 4° C en tampón de hidrólisis frío (2,5 M NaCl (Panreac, Cat. Nº 141659.18), 0,1 M sal de sodio EDTA (Panreac, Cat. Nº 131669.1211), 10 mM Tris, 1% Triton X-100 (Merck, Cat. Nº 11869), ajustado a pH 10). De los 3 portaobjetos por muestra, dos de ellos son incubados 30 min a 37° C en una cámara húmeda tras realizar 3 lavados con PBS 1x en frío; a uno de los portaobjetos se le añade FPG 1U (New England Biosciences, Massachusetts, EE. UU.), mientras que el otro es empleado como control y se incuba por tanto únicamente con el tampón enzimático (NEBufferTM + 10 mg/mL BSA, New England Biosciences). El tercer portaobjetos se mantiene en tampón de lisis hasta que finaliza la incubación de los otros dos.

Pasado el tiempo de incubación en la estufa, los geles se incuban a 4° C durante 10 min para detener el proceso de acción enzimático, tras lo cual se hacen 3 lavados con PBS 1x frío. A continuación, se sumergen los portaobjetos en tampón de electroforesis en frío (0,3 M NaOH (Panreac, Cat. Nº 131687.1214), 1 mM sal de sodio EDTA, pH 13) para permitir el desenrollamiento de las cadenas de ADN durante 30 min, llevándose a cabo posteriormente la electroforesis 30 min a 21 V (0,73 V/cm) en un tanque de electroforesis vertical (Fisher Scientific). Para neutralizar el tampón de electroforesis, se realizan 3 lavados con PBS 1x en frío

seguidos de uno en agua destilada, para finalmente dejar secar al aire y deshidratar mediante etanol absoluto (EtOH) (Panreac, Cat. Nº 141086.1212) durante 5 min.

La tinción de los geles se realiza con el agente intercalante GelRed (Biotium, California, EE. UU.) realizando un conteo de al menos 50 núcleos por gel, adquiridos con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX – 61 (Tokio, Japón) mediante una cámara CCD Olympus DP70, usando un filtro de excitación en verde ($\lambda=540-580$ nm).

Para la cuantificación del daño al ADN, se usa el programa CometScore Pro (Tritek Corp., Virginia, EE. UU.) en el cual se cuantifica el % de ADN formado en la cola de los cometas, calculándose la mediana de estos para cada una de las muestras (100 cometas). El daño observado por la presencia de sitios sensibles a FPG se obtiene restando el % de ADN en la cola obtenido en las muestras incubadas con la enzima frente a aquellas que no han sido tratadas. Los resultados obtenidos se representan como la mediana de los tres experimentos con su rango intercuartílico correspondiente.

9. Evaluación de los cambios en la expresión génica: Real-Time qRT-PCR

Para completar los análisis sobre el potencial daño al ADN que tanto el TBBPA como los PSNPs puedan ocasionar, se analiza la expresión de genes involucrados tanto en reparación del daño al ADN como de aquellos relacionados con procesos de estrés oxidativo. De forma adicional, también se ha estudiado la expresión de genes relacionados con los procesos de diferenciación en las Caco-2. Los cebadores empleados para ello se detallan a continuación, en la Tabla 5:

TABLA 5. Cebadores utilizados para la evaluación mediante Real-Time qRT-PCR.

Rol	Gen	Cebadores
Daño ADN	OGG1 (Forward)	5' - GAGCCCCCAGACCAACAAGG -3'
	OGG1 (Reverse)	5' - TGGGGTCCGAGAAAGGTCAT - 3'
	ATM (Forward)	5' - GGACAGTGGAGGCACAAAAT - 3'
	ATM (Reverse)	5' - GTGTCTGAAGACAGCTGGTGA - 3'
	ATR (Forward)	5' - CTCGCTGAACTGTACGTGGA - 3'
	ATR (Reverse)	5' - GCATAGCTCGACCATGGATT - 3'
	PARP1 (Forward)	5' - AAGGCGAATGCCAGCGTTAC - 3'
	PARP1 (Reverse)	5' - GCACTCTGGAGACCATGTCA - 3'

Estrés oxidativo	GSTP1 (Forward)	5' - TGGACATGGTGAATGACGGCGT - 3'
	GSTP1 (Reverse)	5' - GGTCTCAAAGGCTTCAGTTGCC - 3'
	NRF2 (Forward)	5' - CAGTCAGCGACGGAAAGAGT - 3'
	NRF2 (Reverse)	5' - ACCTGGGAGTAGTTGGCAGA - 3'
	SOD2 (Forward)	5' - CTGGACAAACCTCAGCCCTAAC - 3'
	SOD2 (Reverse)	5' - AACCTGAGCCTTGGACACCAAC - 3'
Housekeeping	18S (Forward)	5' - AACGTCTGCCTATCAACTTT - 3'
	18S (Reverse)	5' - TGGATGTGGTAGCCGTTTTCT - 3'
	CycloB (Forward)	5' - GCAAGATCGAGGTGGAGAAG - 3'
	CycloB (Reverse)	5' - CTGTGGAATGTGAGGGGAGT - 3'
Marcadores de diferenciación	ALPI (Forward)	5' - GCTCAGGACAGCAAAGCCTA - 3'
	ALPI (Reverse)	5' - AGGTGGGAGCAGGATAACT - 3'
	MDR1 (Forward)	5' - GTAGCGGCTCTCCAAGCTC - 3'
	MDR1 (Reverse)	5' - AGGGTTAGCTTCCAACCACG - 3'
	TJP1 (Forward)	5' - ACCAGAAATACCTGACGGTGC - 3'
	TJP1 (Reverse)	5' - AGGGTTTTCTTGGCTGACA - 3'

Se emplearon placas de 6 pocillos, en las que se sembraron las células con las densidades de siembra mencionadas anteriormente. Para la extracción del ARN se ha empleado el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Cat. 74106) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se determinó la calidad del ARN mediante cuantificación espectrofotométrica con Nanodrop (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.) y análisis de la integridad mediante PCR convencional en gel de agarosa/poliacrilamida. La Real-Time qRT-PCR se realizó en la Unidad Genómica del Parque Científico de Madrid.

El análisis de la cuantificación de la expresión génica para determinar la regulación positiva o negativa de los genes de estudio se realiza con el método $\Delta\Delta CT$, por el cual se calcula la expresión génica relativa de las muestras; concretamente la diferencia entre el valor Ct (cycle threshold) de la muestra frente al Ct del control (gen *housekeeping*).

10. Morfología celular de células intestinales diferenciadas

Para evaluar si los compuestos de estudio, o su mezcla, influían de algún modo sobre la morfología celular de las líneas celulares intestinales, se sembraron las células Caco-2 y el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX, sobre insertos *transwell* para mimetizar la situación fisiológica en el intestino. Estos insertos permiten separar los pocillos en dos compartimentos: el apical (AP) que simula la luz intestinal, y el compartimento basolateral (BL), que se asemejaría a la zona interna del organismo. Para ello se siembran 80.000 cel/cm² sobre insertos de policarbonato (PC), de 1,12 cm² y tamaño de poro 0.4 μm (Fisher Scientific, Corning™ Cat. Nº 3401) en placas de 12 pocillos.

Estos insertos son mantenidos siguiendo la misma metodología mencionada anteriormente, realizándose el cambio cada 2-3 días; al llegar al día 7 del proceso de diferenciación, sin embargo, el medio de cultivo de la zona AP se ve reemplazado por medio DMEM libre de suero. Esto se debe a que este hecho además de simular la situación que se da fisiológicamente, permite que las células expresen mejor las características propias de estas células una vez diferenciadas (Ferruzza *et al.*, 2012). Una vez alcanzado el día 21, momento en el cual se consideraron diferenciadas, las células fueron expuestas a las condiciones seleccionadas de las mezclas TBBPA-PSNPs durante 24 h, tras las cuales se procedieron a fijar los insertos. La fijación se llevó a cabo empleando diferentes fijadores, en función del método de observación por microscopía empleado:

10.1. Microscopía confocal

En este caso, previo lavado con PBS 1x, los insertos fueron fijados con paraformaldehído (PFA) 4% durante 15 min a 4° C. Tras 3 lavados de 5 min con PBS 1x, se permeabilizaron las células con Triton X-100 0,05% (v/v) 10 min a 4° C, seguido de 3 lavados de 5 min con PBS/BSA 1% (v/v).

Para la tinción de los filamentos de actina, se empleó Faloidina-Alexa Fluor 546 en dilución (1:40) en PBS/BSA 1%. Esto se realizó incubando sobre Parafilm en el interior de una cámara húmeda, tanto en el lado basolateral como apical de los insertos a 37°C 1 h en una estufa.

Tras la incubación con Faloidina-Alexa Fluor 546, se procedió a teñir los núcleos con DAPI en dilución (1:500), realizando 3 lavados previos con PBS/BSA 1% (v/v) de 5 min cada uno. Para la tinción con DAPI, se realizó el mismo procedimiento que con la Faloidina-Alexa Fluor 546, colocando los insertos en una cámara húmeda, con la diferencia de que la incubación se realizó 5 min a RT. Por último, tras 3 lavados con PBS 1x, se procedió a cortar las membranas del inserto empleando para ello un escalpelo, y se colocan sobre un portaobjetos (con el lado de las células hacia arriba). Tras añadir 10 μL de ProLong Gold Antifade (Invitrogen, Cat. Nº P10144), se procede a cubrir la membrana con un cubreobjetos, para finalmente sellarlo con laca tras eliminar el exceso de ProLong.

Para la visualización de las muestras, se usó un microscopio de barrido láser confocal LSM710, acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss). Para la captura de las imágenes se empleó el programa Zeiss Zen2010B sp1 (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

10.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Tras un lavado previo con PBS 1x, los insertos fueron fijados en una solución de paraformaldehído 4%/glutaraldehído 2% en tampón fosfato 0,1M pH 7,4 durante 2 h a temperatura ambiente, tras las cuales se realizaron 3 lavados de 10 min en tampón fosfato 0,1M pH 7,4. Tras esta fijación, el resto de pasos se llevaron a cabo en el servicio de MET del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO).

A continuación, se procedió a realizar una postfijación con una mezcla de tetróxido de osmio 1% en agua bidestilada y ferrocianuro potásico durante 1 h a 4° C. Finalizado este paso, se realizaron 3 lavados de 5 min en agua bidestilada, a temperatura ambiente. Se prosigue añadiendo ácido tánico 0,15% durante 1 min en tampón fosfato 0,1M pH 7,4, seguido de un lavado de 5 min en el mismo tampón a temperatura ambiente y, por último, dos lavados de 5 min en agua bidestilada a temperatura ambiente. Para finalizar con la postfijación, se realiza un contraste con acetato de uranilo al 2% en agua durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad, seguido de 3 lavados con agua bidestilada.

Una vez realizados estos pasos, se procede con la deshidratación con etanol, mediante una serie de lavados secuenciales de 5-10 min cada uno en etanol 50%, 75%, 90%, 95% y, por último, tres lavados con etanol absoluto. Todos estos lavados se realizan a 4° C.

Para finalizar, se realiza la infiltración. Para ello se va sustituyendo el etanol progresivamente por Epon, la cual es una resina epoxi, mediante una serie de pasos:

1. Epon:etanol (1:2), 60 min a temperatura ambiente.
2. Epon:etanol (1:1), 60 min a temperatura ambiente.
3. Epon:etanol (2:1), 60 min a temperatura ambiente.
4. Epon 100% toda la noche a 4° C.

Por último, se cubren con Epon completo y se dejan polimerizar 48 h a 60° C.

Una vez polimerizado, el inserto se fragmenta para realizar cortes ultrafinos de 70 nm en transversal. Para ello, se utiliza un ultramicrotomo Leica Ultracut UCT (Leica, Viena) con una cuchilla de diamante Diatome. Las secciones se recogieron en rejillas de ojal de Cu/Pd, recubiertas con Formvar, las cuales se tiñen con acetato de uranilo al 2% en agua durante 7 min y posteriormente con citrato de plomo de Reynolds durante 3 min.

Para la visualización de las muestras, se utilizó un microscopio electrónico Jeol JEM1400 Flash (Jeol, Tokyo, Japón) equipado con una cámara CMOS Oneview (Gatan, Pleasantville, EE. UU.).

El procesamiento de las imágenes en ambos casos se llevó a cabo mediante Fiji 2.9.0 (Schindelin *et al.*, 2012) y los plugins Bio-Formats para ImageJ 6.12.0 (Linkert *et al.*, 2010).

11. Análisis estadístico

Los valores de fluorescencia obtenidos en los ensayos de citotoxicidad son expresados en % respecto a su correspondiente control una vez que los valores blanco de fluorescencia, pertenecientes a aquellos pocillos en los que no se sembraron células, son sustraídos. Las representaciones gráficas realizadas representan los datos obtenidos de cada réplica de forma individual, al igual que se muestra la media y la desviación estándar (SD) (o lo que corresponda en su caso, lo cual será indicado en el pie de figura correspondiente) usando el programa GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, EE. UU.). Este programa también se emplea

para la evaluación de la normalidad y la homocedasticidad de los datos, permitiendo su análisis estadístico y realización de comparaciones múltiples; los diferentes tests estadísticos empleados en cada uno de los diferentes ensayos se indicarán al pie de las gráficas correspondientes a cada uno de los mismos.

A grandes rasgos, cuando los datos a analizar seguían una distribución gaussiana, se emplearon pruebas paramétricas tales como test de ANOVA de una vía (cuando las varianzas eran estadísticamente iguales) o test de Brown-Forsythe & Welch (cuando no lo eran). Para aquellos datos que no seguían una distribución normal, se empleó la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis.

La determinación del EC_{50} se realizó empleando el mismo programa, tras el análisis de los efectos citotóxicos de los compuestos sobre las diferentes líneas celulares. En el caso de los BDRs, se empleó el paquete Proast ver. 70.3 para el entorno R (4.2.0) durante la realización de las modelizaciones dosis-respuesta, tanto de los compuestos por separado como de las diferentes mezclas.

En el caso de las mezclas de ambos compuestos, se calcularon tanto el CED (dosis crítica efectiva), como el RPF (factor de potencia relativa). Este CED se refiere a los efectos adversos observados a partir de una dosis determinada. Por lo tanto, el CED es la dosis mínima a partir de la cual se da un efecto adverso específico. El RPF se utiliza para cuantificar la potencia relativa de las sustancias con respecto a un efecto determinado; en otras palabras, expresan la potencia tóxica de los componentes individuales presentes en una mezcla en relación con otro de los compuestos presentes en ella, el cual posee una toxicidad bien conocida.

Para la evaluación de estas mezclas, se calculó la influencia de los PSNPs sobre el TBBPA, por lo que el RPF se encuentra asociado a estos PSNPs, mientras que la CED lo hace con el TBBPA. Esto se hizo así porque, aunque el Proast permite realizar el cálculo a la inversa y, por tanto, asociar el RPF al TBBPA y la CED a los PSNPs, la interpretación de estos sigue siendo la misma, pero desde la consideración inversa: en ese caso, se estaría valorando la posible influencia del TBBPA sobre los PSNPs.



RESULTADOS



Parte 1. Evaluación de la toxicidad aguda sobre líneas celulares de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

1.1. Estudio de la citotoxicidad basal

1.1.1. Efectos del TBBPA

La evaluación de la citotoxicidad basal del TBBPA sobre las tres líneas celulares de trucha arcoíris, (RTgill-W1, RTgutGC y RTL-W1) se realizó mediante el uso de la batería de ensayos de citotoxicidad AB y CFDA. Las pruebas de interferencia llevadas a cabo para evaluar la posible influencia del TBBPA en los ensayos de citotoxicidad no mostraron diferencias significativas ni en el AB ni en la CFDA-AM.

Las células se expusieron a concentraciones crecientes de TBBPA (1 – 150 μM) durante 24 h en medio de cultivo al 2% de suero (Fig. 11). Tras este periodo, tanto en la actividad metabólica (AB) como en la integridad de la membrana plasmática (CFDA-AM) se obtuvieron unos perfiles toxicológicos similares en las tres líneas celulares, con una notable reducción en la viabilidad entre las concentraciones de 25 y 50 μM de TBBPA para RTgill-W1 y RTL-W1; y entre 50 y 75 μM de TBBPA en el caso de RTgutGC.

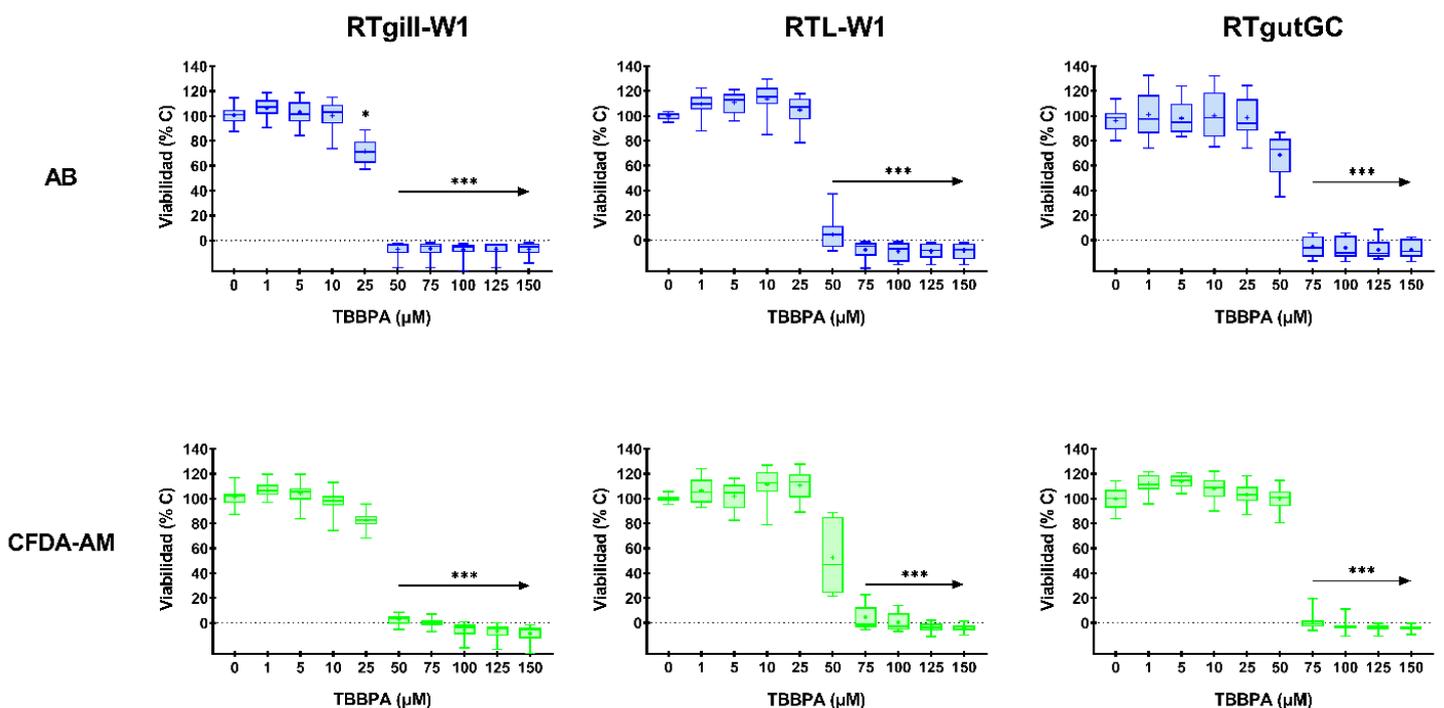


FIGURA 11. Citotoxicidad del TBBPA sobre las líneas celulares de peces. Evaluación de la actividad metabólica (AB) y de la membrana plasmática (CFDA-AM) en las líneas celulares RTgill-W1, RTL-W1 y RTgutGC tras 24 h de exposición.

Gráficas de cajas y bigotes mostrando la media (+), la mediana (línea), rango intercuartílico (límites de la caja) y los valores máximo y mínimo (bigotes). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) con el control tras los tests Kruskal – Wallis + Dunn o Brown-Forsythe & Welch ANOVA + Dunnett T3 (AB RTgutGC). $n = 18$, 3 experimentos independientes.

A partir de estos datos de citotoxicidad, se calcularon distintos valores de relevancia toxicológica, tanto los EC_{50} como las *Benchmark Dose Responses* (BDRs), obteniendo de esta forma las denominadas *Benchmark Doses* (BMDs). En la Tabla 6 puede observarse que los efectos ejercidos por el TBBPA sobre las RTgill-W1 son apreciables a dosis bajas, viéndose una mayor susceptibilidad a nivel metabólico. En las otras dos líneas

celulares estos efectos comienzan a vislumbrarse en concentraciones ligeramente superiores, aunque la línea celular RTL-W1 parece algo más sensible a nivel de integridad de la membrana plasmática en comparación con las RTgill-W1 y las RTgutGC. Estas últimas resisten mejor de forma general los efectos del TBBPA, aunque parecen ser ligeramente más sensibles a nivel metabólico que las RTL-W1.

Los valores de EC₅₀ corroboran que las RTgill-W1 son la línea celular más sensible al TBBPA, con datos de EC₅₀ que resultan en aproximadamente la mitad de los obtenidos para la línea celular RTgutGC. En el caso de la línea RTL-W1, los valores de EC₅₀ muestran una sensibilidad intermedia para este compuesto.

TABLA 6. Valores de relevancia toxicológica para el TBBPA (μM) en las líneas celulares de peces.

		BMD _{inferior}	BMD _{superior}	EC ₅₀
RTgill W1	AB	7,65	19,20	26,53
	CFDA-AM	12,70	20,90	30,78
RTL W1	AB	28,30	29,00	45,29
	CFDA-AM	9,69	28,20	45,98
RTgutGC	AB	22,40	27,40	50,90
	CFDA-AM	23,20	27,90	60,04

Tamaño del efecto crítico (CES = 0,05)

Aunque las tres líneas celulares muestran ser susceptibles al TBBPA, estos resultados sugieren que la línea celular más sensible es la correspondiente a las RTgill-W1; por este motivo, el resto de los estudios se realizaron en esta línea celular.

1.1.2. Efectos de los PSNPs

Además de evaluar los efectos del TBBPA, también se estudió el potencial citotóxico de los PSNPs sobre esta línea celular de trucha arcoíris. Para ello, previamente se realizó la correspondiente caracterización de estos PSNPs bajo nuestras condiciones experimentales. La Fig. 12 y la Tabla 7 recogen los resultados obtenidos, mostrando cómo curiosamente, los PSNPs poseen una capacidad de agregación más elevada en la concentración de 1 μg/mL en comparación con la de 10 μg/mL. Aun así, parecen estabilizarse tras su incubación en el medio de cultivo tras 24 h. El potencial Z de estas nanopartículas (-36,37 ± 1,19 mV) corrobora el hecho de que se encuentran carboxiladas en su superficie.

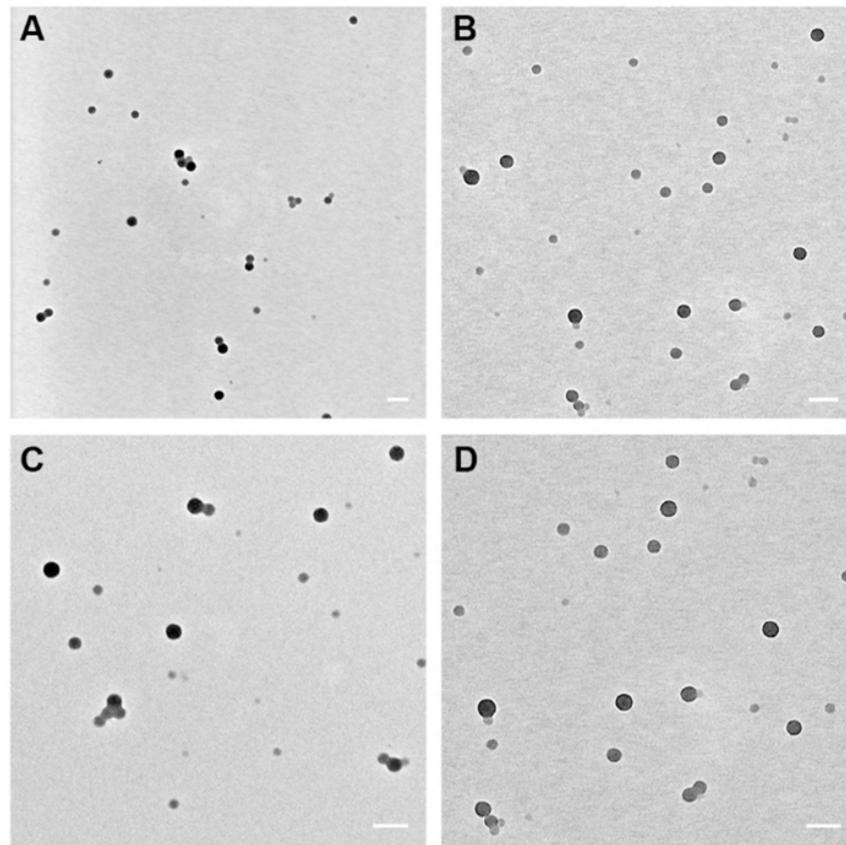


FIGURA 12. Caracterización de los PSNPs en MET bajo las condiciones experimentales planteadas. Imágenes representativas de la dispersión de los PSNPs en el medio de cultivo empleado (L-15 + 2% FBS). A: 1 µg/mL (t = 0); B: 10 µg/mL (t = 0); C: 1 µg/mL tras 24 h de incubación a 37°C. D: 10 µg/mL tras 24 h de incubación a 37°C. Escala 100 nm.

TABLA 7. Distribución del tamaño de los PSNPs en medio de cultivo L-15. Valores de distribución obtenidos (n = 3) para los PSNPs empleados.

Concentración	Solvente	t (h)	Promedio Z (d.nm)	Pico principal ^a (d.nm)	PDI
10 mg/mL (stock)	H ₂ O	-	57,18 ± 22,23	55,71 ± 19,41	0,165 ± 0,01
1 µg/mL	L-15	0	139,77 ± 17,14	142,20 ± 14,83	0,24 ± 0,04
1 µg/mL	L-15 + 2 % FBS	0	202,97 ± 17,60	153,30 ± 11,03	0,42 ± 0,13
1 µg/mL	L-15 + 2 % FBS	24	151,01 ± 5,20	84,10 ± 0,95	0,57 ± 0,01
10 µg/mL	L-15	0	62,45 ± 0,85	68,61 ± 3,64	0,15 ± 0,04
10 µg/mL	L-15 + 2 % FBS	0	146,45 ± 41,22	73,35 ± 5,76	0,26 ± 0,02
10 µg/mL	L-15 + 2 % FBS	24	61,59 ± 0,44	83,76 ± 0,94	0,28 ± 0,01

^aReferido al pico principal según la distribución de tamaños por intensidad

Condiciones de medida: T = 25 °C; Índice de refracción (IR) del dispersante 1,330; viscosidad del dispersante 0,08872 cP; IR material 1,59

La determinación de posibles interferencias por parte de estos PSNPs con los fluorocromos de las pruebas de citotoxicidad mostró que, si bien no interfieren en absoluto con el AB, sí que lo hacen con la CFDA-AM, aumentando la intensidad de fluorescencia independientemente de la presencia de células en el ensayo. Por lo tanto, se realizó la corrección de este fenómeno sustrayendo los valores de los pocillos control con respecto a los valores obtenidos para los pocillos tratados.

La exposición de las células a concentraciones crecientes de PSNPs (1 – 200 µg/mL) durante 24 h en medio de cultivo al 2% de suero evidenció un efecto citotóxico relativamente bajo (Fig. 13). El ensayo de AB resultó ser el más sensible, mostrando efectos significativos sobre el metabolismo celular a partir de la concentración de 25 µg/mL.

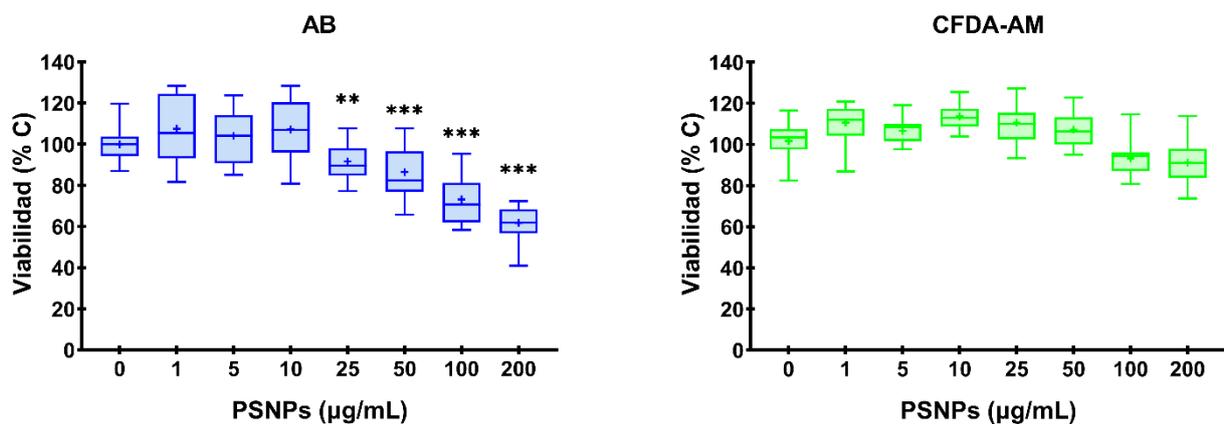


FIGURA 13. Citotoxicidad de los PSNPs en la línea celular RTgill-W1. Evaluación del AB y de la CFDA-AM en la línea celular RTgill-W1 tras 24 h. Representación de cajas y bigotes en la que se incluyen la media (+), la mediana (línea), rango intercuartílico (límites de la caja) y los valores máximo y mínimo (bigotes). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al grupo control tras el test Brown-Forsythe & Welch ANOVA + Dunnett T3. $n = 18$, 3 experimentos independientes.

El análisis de las BMDs en la línea RTgill-W1 confirma que se empieza a apreciar un cierto efecto a nivel metabólico a concentraciones bajas, mientras que en comparación parece tener un menor impacto a nivel de la membrana plasmática, como se ve en la Tabla 8.

TABLA 8. Valores de relevancia toxicológica para los PSNPs en la línea celular RTgill-W1.

		BMD _{inferior}	BMD _{superior}
RTgill-W1	AB	4,58	27,50
	CFDA-AM	31,70	80,10

Tamaño del efecto crítico (CES = 0,05)

1.1.3. Citotoxicidad basal de la combinación TBBPA-PSNPs en la línea celular RTgill-W1

Para determinar si los PSNPs pueden modificar de alguna forma la citotoxicidad del TBBPA, se seleccionaron una serie de concentraciones de interés en función de los resultados previos obtenidos de manera individual para ambos compuestos.

Para ello, se eligió una concentración de PSNPs que no presentaba efectos citotóxicos de ningún tipo (10 µg/mL), así como las concentraciones 5, 10 y 25 µM de TBBPA. En las dos primeras no se aprecian efectos

citotóxicos reseñables, mientras que la última es la concentración a partir de la cual se empiezan a observar efectos en la línea celular RTgill-W1.

Como se puede ver en la Fig. 14, los efectos de la combinación TBBPA-PSNPs son desiguales y no parecen seguir un patrón claro. A nivel metabólico, se observa una cierta potenciación de los PSNPs sobre la citotoxicidad del TBBPA, especialmente en la condición de 10 μM TBBPA, efecto que no se observa en ninguna de las otras condiciones. Este hecho vuelve a ponerse de manifiesto en cuanto a nivel de integridad de la membrana plasmática. Por lo tanto, la influencia de los PSNPs sobre los efectos citotóxicos del TBBPA parece ejercer un ligero efecto potenciador.

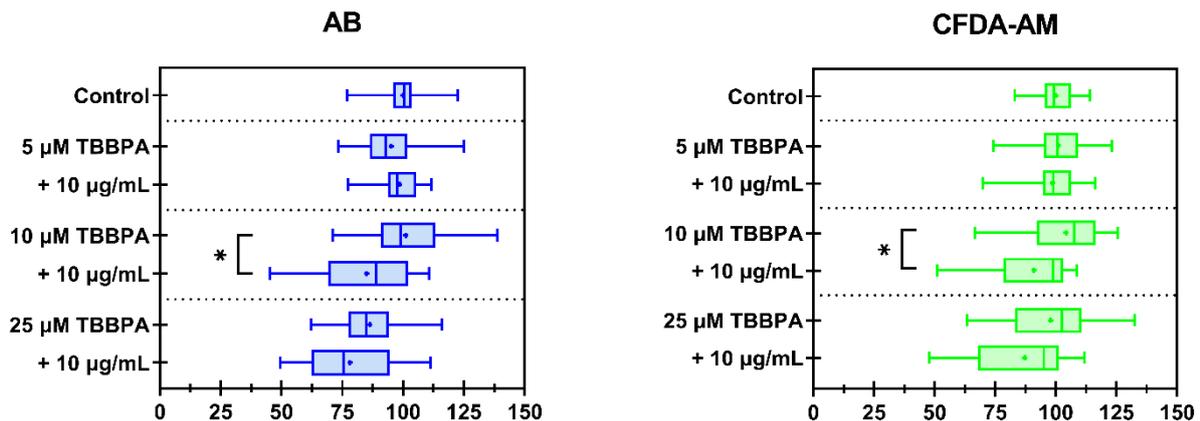


FIGURA 14. Citotoxicidad de la combinación del TBBPA y los PSNPs en la línea celular RTgill-W1. Evaluación del AB y de la CFDA-AM en la línea celular RTgill-W1 tras 24 h de exposición. Representación de cajas y bigotes en la que se incluyen la media (+), la mediana (línea), rango intercuartílico (límites de la caja) y los valores máximo y mínimo (bigotes). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) de las posibles combinaciones vs. la exposición individual al TBBPA tras los tests Brown-Forsythe & Welch ANOVA + Dunnett T3 (AB), ANOVA de una vía + Dunnett (CFDA-AM 5 μM) y tests Kruskal – Wallis + Dunn (CFDA-AM 10 and 25 μM). $n=18$, 3 experimentos independientes.

Las BMDs confirman estas observaciones (Fig. 15, Tabla 9) ya que el factor de potencia relativa (RPF) asociado a los PSNPs es muy bajo en comparación con la dosis crítica efectiva (CED) del TBBPA, lo que indica que en estas combinaciones el compuesto que modula el efecto tóxico sobre las células es mayoritariamente el TBBPA. Aun así, parece que el efecto ejercido por parte de los PSNPs es ligeramente más acusado sobre la actividad metabólica.

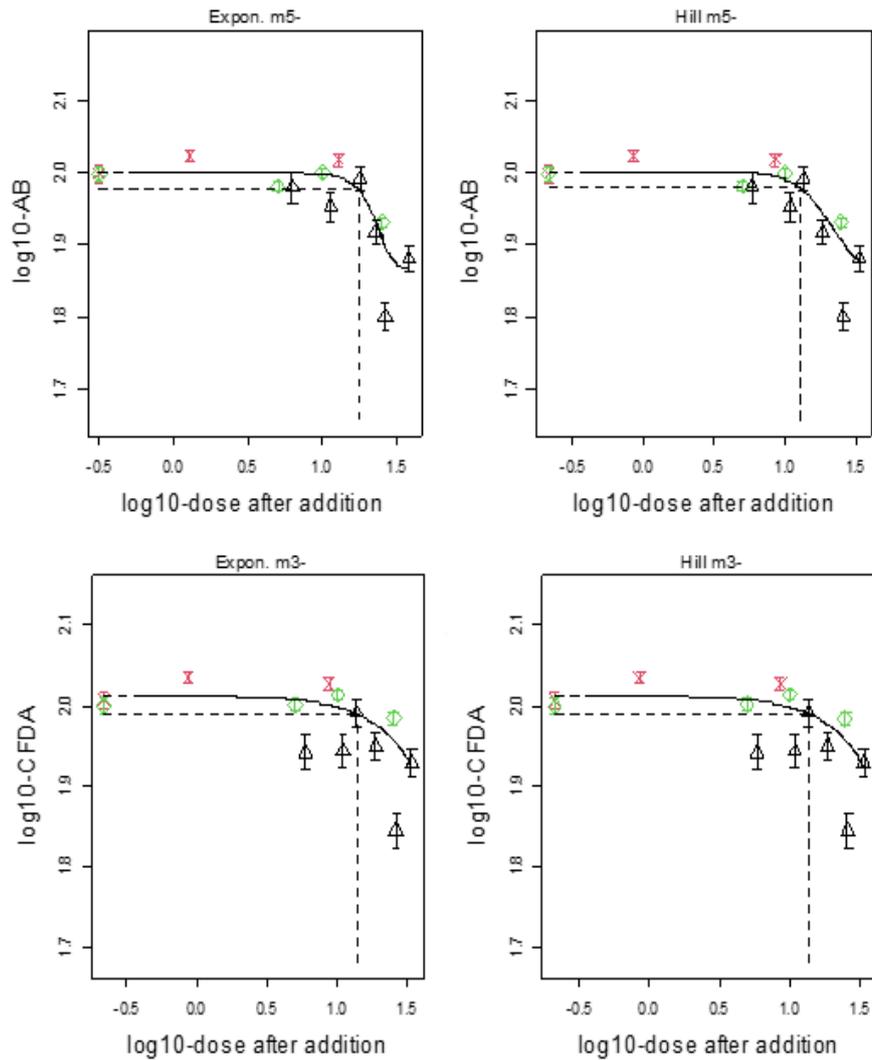


FIGURA 15. Curva dosis-respuesta TBBPA-PSNPs en la línea celular RTgill-W1. Modelizaciones exponenciales y de Hill empleadas para el cálculo de las BMR tras 24 h de exposición para el AB (arriba) y la CFDA-AM (abajo). Se indican los valores medios y las DS de las distintas condiciones: mezclas (triángulos negros), PSNPs (cruces rojas) y TBBPA (diamantes verdes).

TABLA 9. Valores de BDR de la combinación TBBPA-PSNPs en la línea celular RTgill-W1 tras 24 h de exposición.

			BMD _{inferior}	BMD _{superior}
RTgill-W1	AB	CED-TBBPA	7,84	18,50
		RPF-PSNPs	0,43	1,51
	CFDA-AM	CED-TBBPA	6,15	20,40
		RPF-PSNPs	0,16	1,44

CED = Dosis crítica efectiva; RPF = Factor de potencia relativa
 Tamaño del efecto crítico (CES = 0,05)

1.2. Ensayos de toxicidad específica

1.2.1. Evaluación del metabolismo oxidativo/estrés oxidativo y el potencial de membrana mitocondrial

Para determinar los potenciales efectos que pudieran tener las combinaciones de TBBPA-PSNPs previamente seleccionadas sobre el metabolismo oxidativo, se estudió el impacto que estas combinaciones tenían sobre el potencial de membrana mitocondrial y sobre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Para ello, se evaluó el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) mediante el fluorocromo TMRM, mientras que para la evaluación de ROS se empleó la sonda fluorescente H₂DCFDA.

Al igual que se realizó con el AB y la CFDA-AM, se evaluó la posible interferencia de los compuestos de estudio con los fluorocromos utilizados en estos ensayos. Los resultados indican la existencia de diferencias significativas en la evaluación con el TMRM, no así con la H₂DCFDA. Por lo tanto, al igual que se realizó para la CFDA-AM, se sustrajo el valor de los pocillos control (sin células) tratados con las correspondientes condiciones experimentales, a aquellos homólogos en presencia de células para corregir esta interferencia.

Como se puede observar en las Figs. 16A y 16B, ambas aproximaciones experimentales muestran una tendencia similar. Las concentraciones de 10 μ M de TBBPA, así como la de 10 μ g/mL de PSNPs por separado, no muestran diferencias significativas con respecto a las células sin tratar, como así tampoco lo hace la combinación de ambos. Solo la concentración de 25 μ M TBBPA presenta diferencias significativas con respecto a las células control, tanto de forma individual como en combinación. No obstante, la presencia de PSNPs no modifica el efecto del TBBPA individual, al no encontrarse diferencias significativas entre ambas condiciones, lo que confirma que los efectos perniciosos que se observan se deben fundamentalmente al TBBPA.

También debe destacarse que, mientras que en el caso de la H₂DCFDA estas diferencias se deben a un aumento en la intensidad de fluorescencia, en el TMRM se observa el efecto contrario, por lo que la presencia de 25 μ M de TBBPA supone un aumento en la generación de ROS, así como una despolarización de la membrana mitocondrial en estas células.

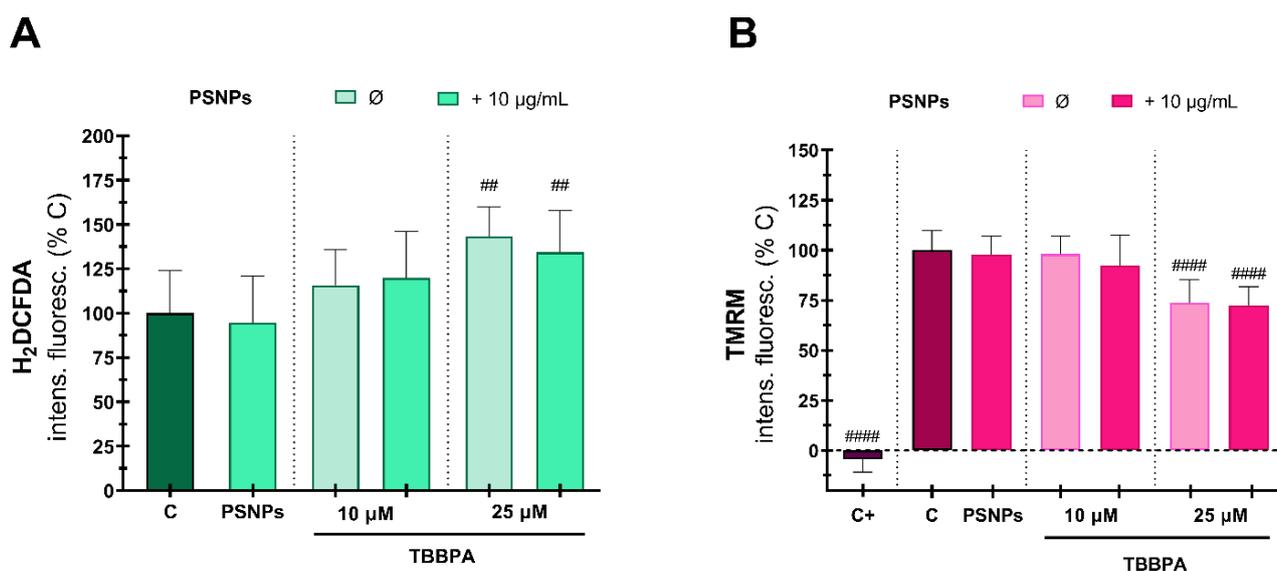


FIGURA 16. Efectos de la combinación TBBPA-PSNPs sobre el metabolismo oxidativo. Diagrama de barras (media y DS) para la producción de ROS (A) y el potencial de membrana mitocondrial (B), en la línea celular RTgill-W1 tras 24 h de exposición. C+: 50 μ M de CCCP durante 24 h. Las almohadillas indican las diferencias significativas con respecto a las

células control ($p \leq 0,05$). Tests de Brown-Forsythe & Welch ANOVA + Dunnett T3 (6A) y ANOVA de una vía + Dunnett (6B). $n=18$, 3 experimentos independientes.

1.2.2. Efectos genotóxicos de la combinación TBBPA-PSNPs

Para determinar la posible genotoxicidad que pudiera ejercer el TBBPA y los PSNPs, tanto por separado como en combinación, se utilizó el ensayo del Cometa alcalino para la determinación de roturas de cadena simple o doble, así como una modificación de éste utilizando la enzima FPG para evaluar la presencia de posibles efectos de daño oxidativo al ADN.

En la Fig. 17A, correspondiente al ensayo del Cometa alcalino clásico, no se aprecian diferencias significativas con respecto al control en ninguna de las condiciones experimentales, lo cual indica que ni el TBBPA ni los PSNPs (así como sus combinaciones), provocan ninguna clase de rotura en el ADN. Sin embargo, en la Fig. 17B, correspondiente al ensayo en el que se implementa la incubación con la enzima FPG, se puede apreciar cómo en la combinación de 25 μM TBBPA + 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSNPs se produce un aumento significativo del daño oxidativo sobre el ADN que no se visualiza al evaluarse estos compuestos por separado.

Por lo tanto, esta combinación parece ejercer un efecto pro-oxidativo moderado sobre el ADN, apreciable únicamente al realizar el ensayo modificado con la enzima FPG.

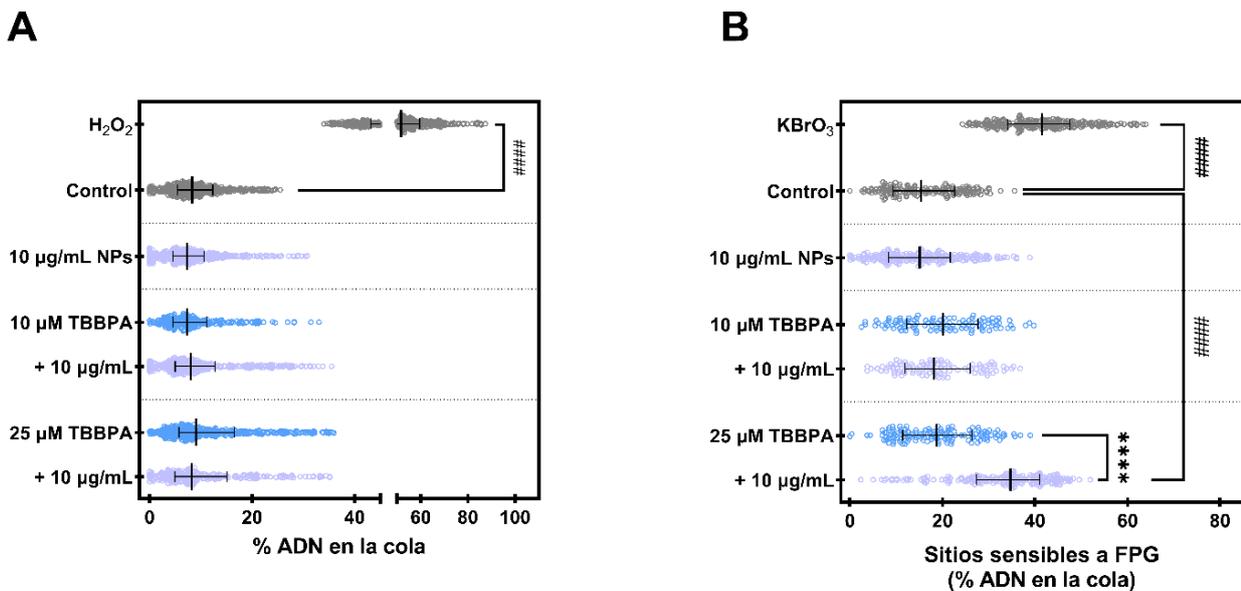


FIGURA 17. Genotoxicidad del TBBPA, los PSNPs y sus combinaciones en la línea celular RTgill-W1. Cometa alcalino (A) y modificación con la enzima FPG (B) mostrando el % de ADN en la cola, tras 24 h de exposición. Representación de dispersión de puntos, mediana (línea) y rango intercuartílico de 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas frente a las condiciones de TBBPA individuales ($p \leq 0,05$), mientras que las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p \leq 0,05$). Tests de Brown-Forsythe & Welch ANOVA + Dunnett T3 (7A) y ANOVA de una vía + Dunnett (7B). 3 experimentos independientes.

Parte 2. Evaluación de la toxicidad aguda sobre células intestinales humanas

2.1. Estudio de la citotoxicidad basal

2.1.1. Efectos del TBBPA

Al igual que en el caso de las líneas celulares de peces, esta determinación se realizó valorando la integridad celular a diferentes niveles empleando la batería de ensayos complementarios de AB/CFDA/RN. Las células se expusieron durante 24 h al TBBPA empleando el mismo rango de concentraciones de 1 – 150 μM , en medio de cultivo al 10% de suero. Se emplearon las líneas celulares Caco-2, HT29-MTX y su co-cultivo.

En el caso de la línea celular Caco-2 (Fig. 18), se aprecia que la actividad metabólica se ve comprometida a partir de 100 μM , al igual que ocurre con la integridad de la membrana plasmática y los lisosomas.

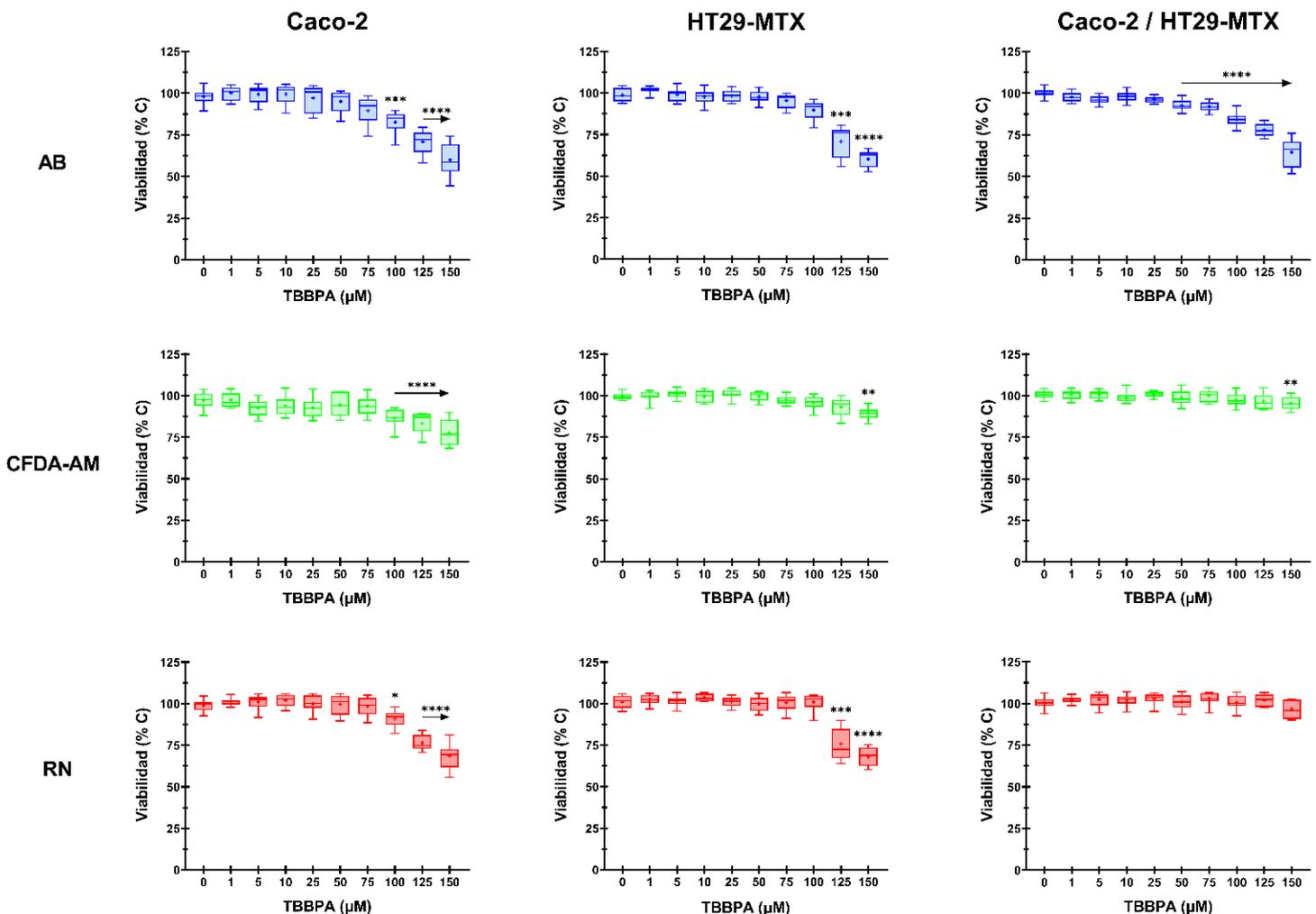


FIGURA 18. Citotoxicidad del TBBPA en las líneas celulares Caco-2, HT29-MTX y el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Evaluación del AB, CFDA-AM y RN tras 24 h de exposición. Gráficas de cajas y bigotes mostrando la media (+), la mediana (línea), rango intercuartílico (límites de la caja) y los valores máximo y mínimo (bigotes). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) con el control tras los siguientes tests: Kruskal-Wallis + Dunn (AB y RN) y ANOVA de una vía + Dunnett (CFDA-AM) en Caco-2; Kruskal-Wallis + Dunn (AB y CFDA-AM) y Brown-Forsythe & Welch ANOVA + Dunnett T3 (RN) en HT29-MTX; Kruskal-Wallis + Dunn (AB y RN) y Brown-

Forsythe & Welch ANOVA + Dunnett T3 (CFDA-AM) en el co-cultivo. n=18, 3 experimentos independientes (Caco-2 y Caco-2/HT29-MTX); n= 12, 2 experimentos independientes (HT29-MTX).

Las BMDs muestran que el rango estimado para la CFDA-AM es mucho más amplio que el calculado para las otras dos aproximaciones analizadas (AB y RN). Aun así, estas células parecen ser ligeramente más susceptibles al TBBPA a nivel de integridad de la membrana plasmática (Tabla 10), mientras que en las otras dos valoraciones ejercen un efecto menos acusado, especialmente a nivel lisosomal.

TABLA 10. Dosis de referencia (BMD) de la citotoxicidad basal del TBBPA tras 24 h de exposición en las líneas celulares evaluadas.

		BMD _{inferior}	BMD _{superior}
Caco-2	AB	56,30	72,90
	CFDA-AM	31,90	86,00
	RN	78,50	92,30
HT29-MTX	AB	63,60	81,10
	CFDA-AM	84,80	118,00
	RN	83,30	100,00
Caco-2/HT29-MTX	AB	64,20	74,70
	CFDA-AM	91,50	-
	RN	146,00	-

Tamaño del efecto crítico (CES = 0,05)

(-): valores fuera del rango de dosis

En la línea celular HT29-MTX (Fig. 18), se pueden observar efectos a partir de 125 μ M de TBBPA en los casos del AB y el RN; en la CFDA-AM se aprecia una ligera bajada únicamente en la dosis más elevada.

En este caso, las BMDs indican que en estas células el TBBPA tiene un impacto ligeramente mayor a nivel metabólico, mientras que muestra un nivel de susceptibilidad similar en las diferentes evaluaciones de la integridad de los lisosomas y de la membrana plasmática (Tabla 10); estas células resisten mucho mejor los efectos del TBBPA en comparación con las Caco-2.

Por otro lado, debido a su mayor relevancia fisiológica, se estudiaron los efectos ejercidos por el TBBPA en el co-cultivo de ambas líneas (Caco-2/HT29-MTX), representados en la Fig. 18. Curiosamente se puede apreciar que la viabilidad celular, según la actividad metabólica, disminuye a partir de 50 μ M de TBBPA, cosa que no ocurre en ninguna de las dos líneas por separado. Sin embargo, la integridad de la membrana plasmática sólo se ve comprometida en la dosis más elevada, comportándose igual que en el caso de la línea celular HT29-MTX. En cuanto a la integridad lisosomal, no parece verse afectada en absoluto, por lo que el co-cultivo es más resistente a este nivel.

El análisis de las BMDs reafirma estas observaciones, ya que, como se puede apreciar en la Tabla 10, este co-cultivo muestra una susceptibilidad metabólica prácticamente idéntica a la que se observa en la línea celular HT29-MTX. Sin embargo, presenta una mayor resistencia a los efectos del TBBPA sobre la integridad de la membrana plasmática y de los lisosomas, siendo especialmente notable esta última. Por lo tanto, podemos afirmar que este co-cultivo presenta un comportamiento característico y claramente diferente del que

presentan las líneas celulares por separado, siendo más resistente a los efectos del TBBPA que el que presentan las líneas celulares por separado.

2.1.2. Efectos de los PSNPs

En el caso de las líneas celulares humanas intestinales, el posible potencial toxicológico de los PSNPs se evaluó empleando el rango (1 – 50 µg/mL) en medio de cultivo al 10% de suero. Sin embargo, en este caso en concreto, se evaluó la influencia de los PSNPs empleando este rango únicamente en la línea celular Caco-2 y en el co-cultivo Caco-2/MTX, ya que, debido a la posibilidad de diferenciación, estos modelos resultan más atractivos para su estudio.

Por otra parte, la citotoxicidad del TBBPA muestra que, de existir algún tipo de susceptibilidad, ésta afectará mayoritariamente a la línea Caco-2. Por lo tanto, y teniendo en cuenta que el objetivo es determinar si la mezcla TBBPA-PSNPs modifica el potencial citotóxico del primero, se pretende seleccionar aquellas combinaciones que nos permitan evaluar la presencia de efectos subcitotóxicos al comparar las diferentes combinaciones con los efectos ejercidos por el TBBPA de forma independiente.

La caracterización de estos PSNPs reveló una cierta agregación en el medio de cultivo (Tabla 11), que aumenta en presencia de suero. No obstante, los valores obtenidos en las medidas de DLS no indican una dependencia ni de la concentración utilizada ni del tiempo de incubación, reflejando la estabilidad de las dispersiones. Por otro lado, el índice de polidispersión (PDI) indica que, por lo general, las dispersiones de PSNPs tienden a ser heterogéneas en nuestras condiciones de estudio.

TABLA 11. Distribución del tamaño de los PSNPs en las condiciones experimentales empleadas en las líneas celulares humanas. Valores de distribución obtenidos; 3 experimentos independientes. PDI: índice de polidispersión.

Concentración	Solvente	t (h)	Promedio-Z (d.nm)	Pico principal ^a (d.nm)	PDI
10 mg/mL (stock)	H ₂ O	-	57,18 ± 22,23	55,71 ± 19,41	0,165 ± 0,01
1 µg/mL	DMEM	0	84,63 ± 6,03	40,2 ± 4,52	0,271 ± 0,019
1 µg/mL	DMEM + 10% FBS	0	100,89 ± 10,59	45,77 ± 9,94	0,568 ± 0,010
1 µg/mL	DMEM + 10% FBS	24	80,37 ± 2,87	45,2 ± 11,52	0,661 ± 0,002
50 µg/mL	DMEM	0	59,23 ± 19,45	60,33 ± 20,06	0,097 ± 0,008
50 µg/mL	DMEM + 10% FBS	0	133,20 ± 60,86	127,60 ± 54,45	0,425 ± 0,034
50 µg/mL	DMEM + 10% FBS	24	92,64 ± 45,55	94,02 ± 46,65	0,329 ± 0,52

^aReferido al pico principal según la distribución de tamaños por intensidad

Condiciones de medida: T = 25 °C; Índice de refracción (IR) del dispersante 1,330; viscosidad del dispersante 0,08872 cP; IR material 1,59

Para corroborar el comportamiento de estos PSNPs, se realizaron evaluaciones adicionales mediante MET, reflejando la Fig. 19 que el comportamiento de estas PSNPs es conforme al observado y determinado mediante DLS.

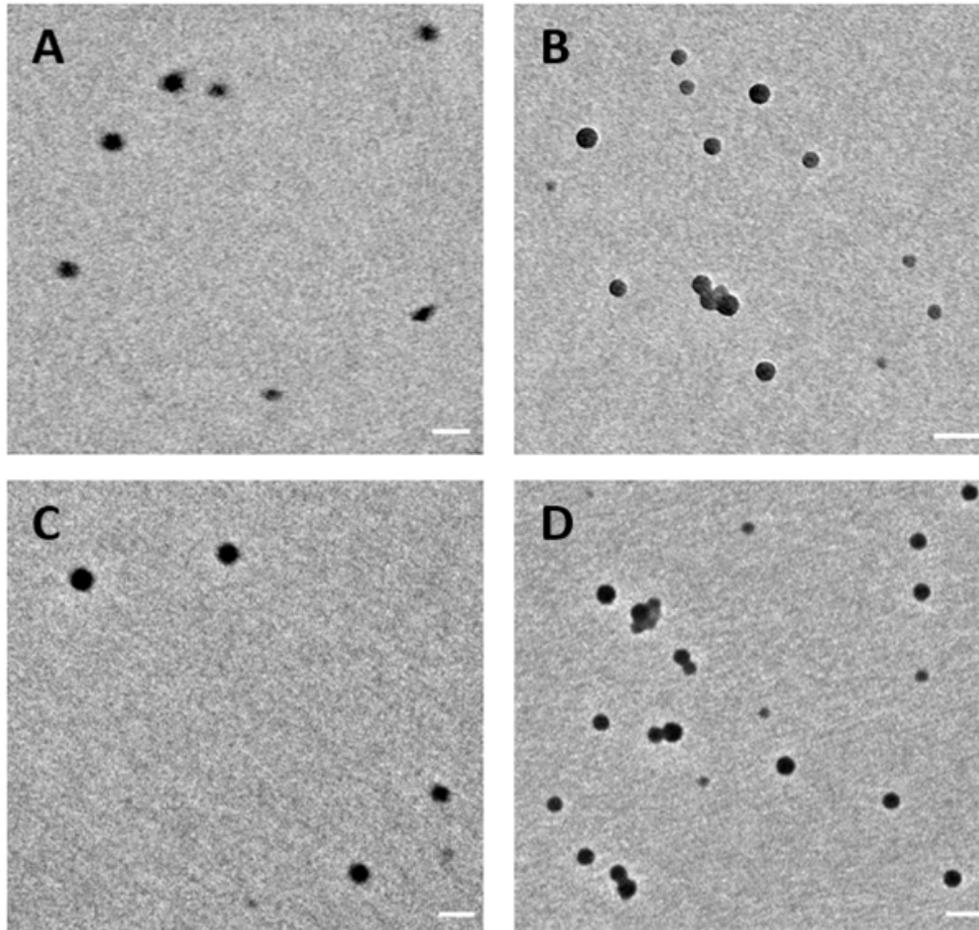


FIGURA 19. Caracterización de los PSNPs en MET bajo las condiciones experimentales planteadas. Imágenes representativas de la dispersión de los PSNPs en el medio de cultivo empleado (DMEM + 10% FBS). A: 1 µg/mL (t=0); B: 50 µg/mL (t=0); C: 1 µg/mL tras 24 h de incubación a 37°C. D: 50 µg/mL tras 24 h de incubación a 37°C. Escala 100 nm.

En el caso de la línea Caco-2, la evaluación de estos PSNPs revela que la citotoxicidad, aunque baja, actúa fundamentalmente a nivel de integridad de la membrana plasmática, observándose diferencias con respecto al control en todas las concentraciones de estudio (Fig. 20).

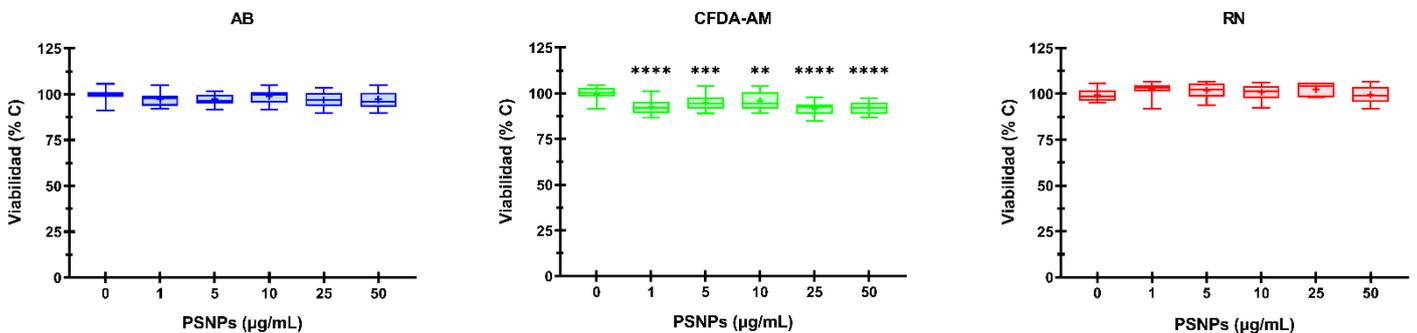


FIGURA 20. Citotoxicidad de los PSNPs en la línea celular Caco-2. Evaluación del AB, CFDA-AM y RN en la línea Caco-2 tras 24 h de exposición a los PSNPs. Gráficas de cajas y bigotes mostrando la media (+), la mediana (línea), rango intercuartílico (límites de la caja) y los valores máximo y mínimo (bigotes). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en relación con el grupo control tras los tests ANOVA de una vía + Dunnett. n=18, 3 experimentos independientes.

En el co-cultivo se observa un muy ligero efecto citotóxico a nivel metabólico en todas las concentraciones de estudio, pero ninguno sobre la integridad de la membrana celular, en contraposición a lo observado en la línea celular Caco-2 (Fig. 21).

Por lo tanto, se puede corroborar que en general, el efecto de los PSNPs sobre estas líneas celulares es limitado.

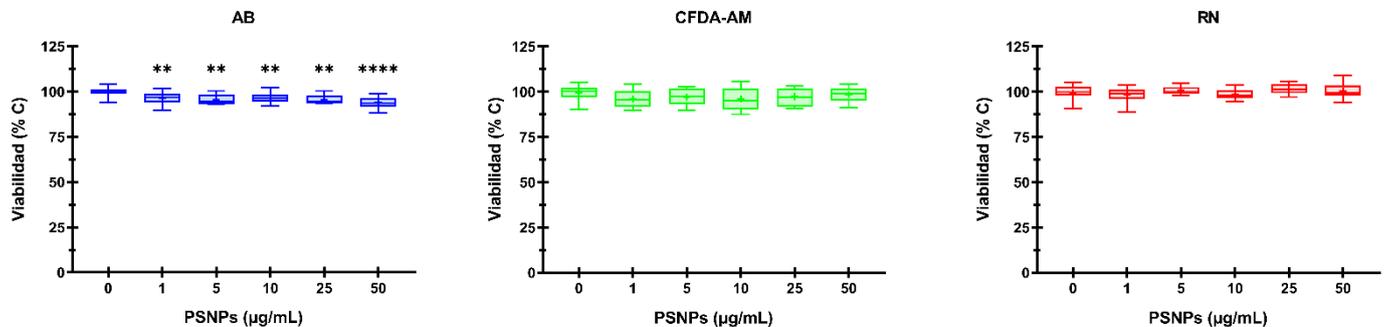


FIGURA 21. Citotoxicidad de los PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Evaluación del AB, CFDA-AM y RN en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX tras 24 h de exposición a los PSNPs. Gráficas de cajas y bigotes mostrando la media (+), la mediana (línea), rango intercuartílico (límites de la caja) y los valores máximo y mínimo (bigotes). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en relación con el grupo control tras los tests Kruskal-Wallis + Dunn (AB), Brown-Forsythe & Welch ANOVA + Dunnett T3 (CFDA-AM) y ANOVA de una vía + Dunnett (RN). $n=18$, 3 experimentos independientes.

2.1.3. Efectos de de las combinaciones TBBPA-PSNPs

Para determinar los efectos de la combinación TBBPA-PSNPs sobre las líneas celulares humanas, se escogieron una serie de concentraciones en función de los resultados obtenidos previamente; para el TBBPA se seleccionaron las siguientes concentraciones: 10 μM , 50 μM y 100 μM . En el caso de los PSNPs se seleccionó la misma concentración empleada anteriormente en las líneas celulares de peces (10 $\mu\text{g/mL}$) y de forma adicional, las concentraciones de 1 y 50 $\mu\text{g/mL}$. De esta forma, las mezclas correspondientes fueron evaluadas tras 24 h de exposición en los diferentes tipos celulares.

En la Fig. 22 se puede observar el efecto ejercido por las diferentes mezclas en la línea celular Caco-2. No se aprecian diferencias reseñables entre las diferentes combinaciones con respecto al efecto citotóxico que ejerce el TBBPA por separado, a excepción de las combinaciones de TBBPA con 1 $\mu\text{g/mL}$ de PSNPs, las cuales presentan diferencias estadísticamente significativas en el caso de la integridad de la membrana plasmática.

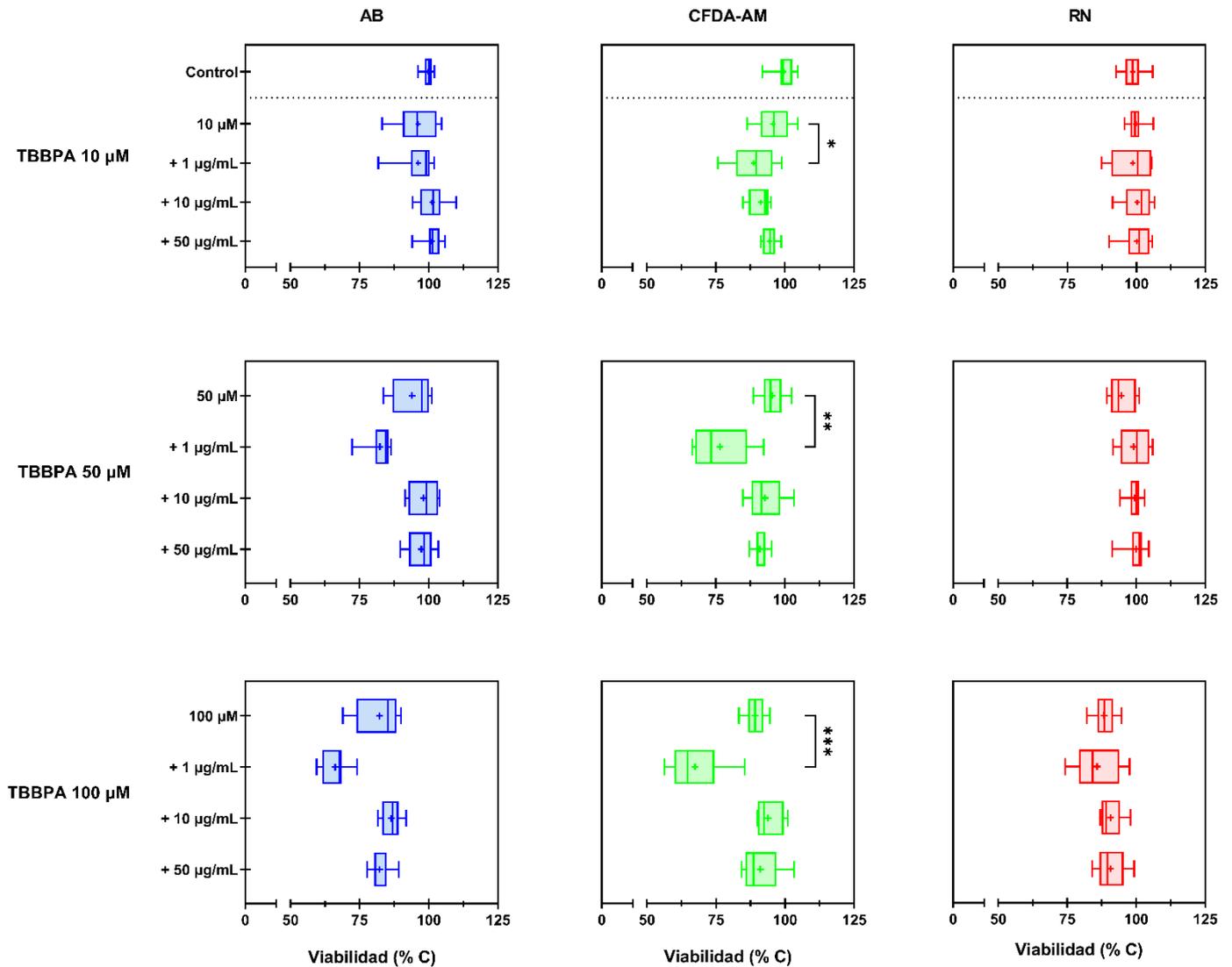


FIGURA 22. Citotoxicidad de la combinación del TBBPA y los PSNPs en la línea celular Caco-2. Evaluación del AB, CFDA-AM y RN en la línea celular Caco-2 tras 24 h de exposición a las diferentes combinaciones de TBBPA-PSNPs. Gráficas de cajas y bigotes mostrando la media (+), la mediana (línea), rango intercuartílico (límites de la caja) y los valores máximo y mínimo (bigotes). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) de las posibles combinaciones vs. la exposición individual al TBBPA tras los tests Kruskal – Wallis + Dunn (AB) y Brown-Forsythe & Welch ANOVA + Dunnett T3 (CFDA-AM y RN). $n=18$, 3 experimentos independientes.

En cuanto a los valores de referencia toxicológicos al analizar la influencia de las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs, las BMDs indican que los plásticos parecen modificar la toxicidad del TBBPA a nivel de la integridad de la membrana plasmática, aunque muy ligeramente, mientras que no ejercen ningún efecto a nivel metabólico ni sobre la integridad lisosomal (Fig. 23, Tabla 12).

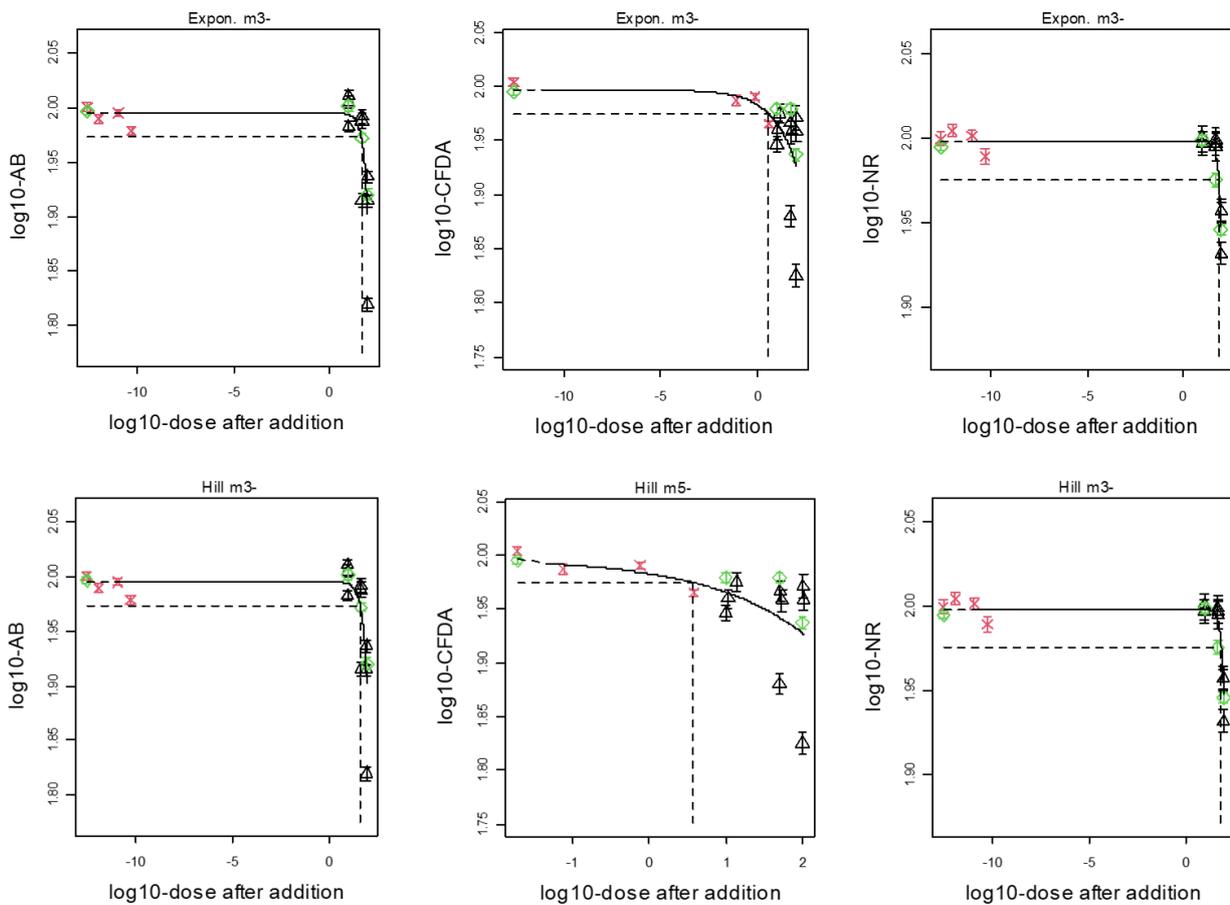


FIGURA 23. Curva dosis-respuesta TBBPA-PSNPs en la línea celular Caco-2. Modelizaciones de Hill y exponenciales empleadas para el cálculo de las BMR tras 24 h de exposición para el AB (izquierda), la CFDA-AM (centro) y RN (derecha). Se indican los valores medios y las DS de las distintas condiciones: mezclas (triángulos negros), PSNPs (cruces rojas) y TBBPA (diamantes verdes).

TABLA 12. Dosis de referencia (BMD) de la combinación TBBPA-PSNPs en la línea celular Caco-2 tras 24 h de exposición.

			BMD _{inferior}	BMD _{superior}
Caco-2	AB	CED-TBBPA	37,30	54,70
		RPF-PSNPs	NA	NA
	CFDA-AM	CED-TBBPA	0,529	12,50
		RPF-PSNPs	0,01	0,26
	RN	CED-TBBPA	65,20	86,20
		RPF-PSNPs	NA	NA

CED = Dosis crítica efectiva; RPF = Factor de potencia relativa
 Tamaño del efecto crítico (CES = 0,05)

Al evaluar la citotoxicidad de las combinaciones en el co-cultivo (Fig. 24), la mezcla de 10 μM TBBPA + 50 $\mu\text{g/mL}$ PSNPs muestra efectos ligeramente más dañinos en comparación con la concentración de TBBPA por separado, tanto a nivel de la actividad metabólica como de la membrana celular. Por otra parte, también se pueden apreciar efectos sobre la integridad de la membrana plasmática al evaluar las mezclas con todas las concentraciones de TBBPA en presencia de 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de PSNPs. No se aprecian diferencias al evaluar la integridad lisosomal.

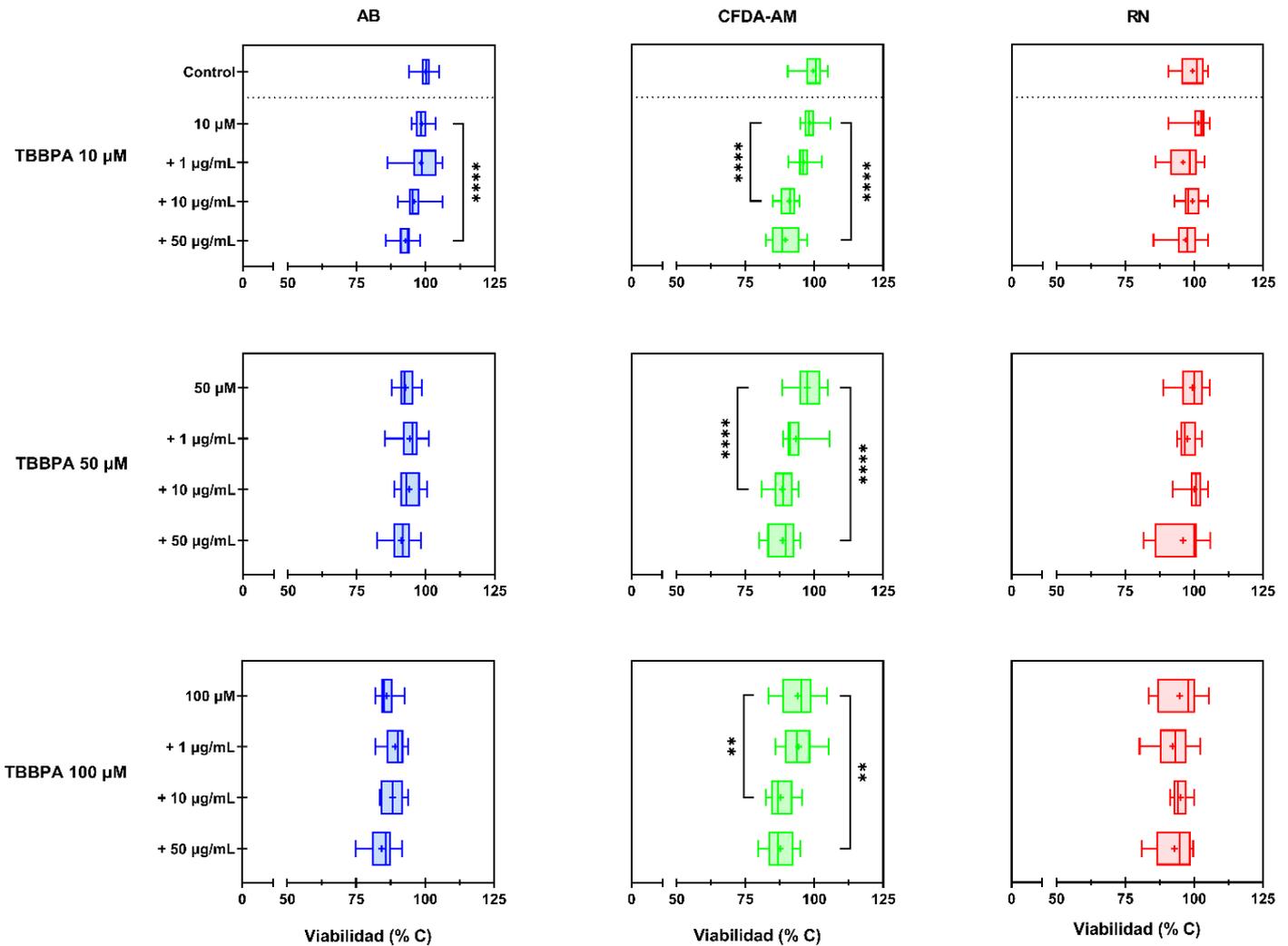


FIGURA 24. Citotoxicidad de la combinación del TBBPA y los PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Evaluación del AB, CFDA-AM y RN en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX tras 24 h de exposición a las diferentes combinaciones de TBBPA-PSNPs. Gráficas de cajas y bigotes mostrando la media (+), la mediana (línea), rango intercuartílico (límites de la caja) y los valores máximo y mínimo (bigotes). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) de las posibles combinaciones vs. la exposición individual al TBBPA tras los tests Brown-Forsythe & Welch ANOVA + Dunnett T3. $n=18$, 3 experimentos independientes.

La modelización para el estudio de las BMDs de las combinaciones indica que en el caso del co-cultivo, los PSNPs parecen tener un efecto claramente notable a nivel de la integridad de la membrana plasmática, aumentando considerablemente el efecto citotóxico del TBBPA a este nivel; sin embargo, tanto a nivel metabólico como a nivel de integridad de los lisosomas, éstos sólo modifican levemente la toxicidad del TBBPA (Fig. 25, Tabla 13).

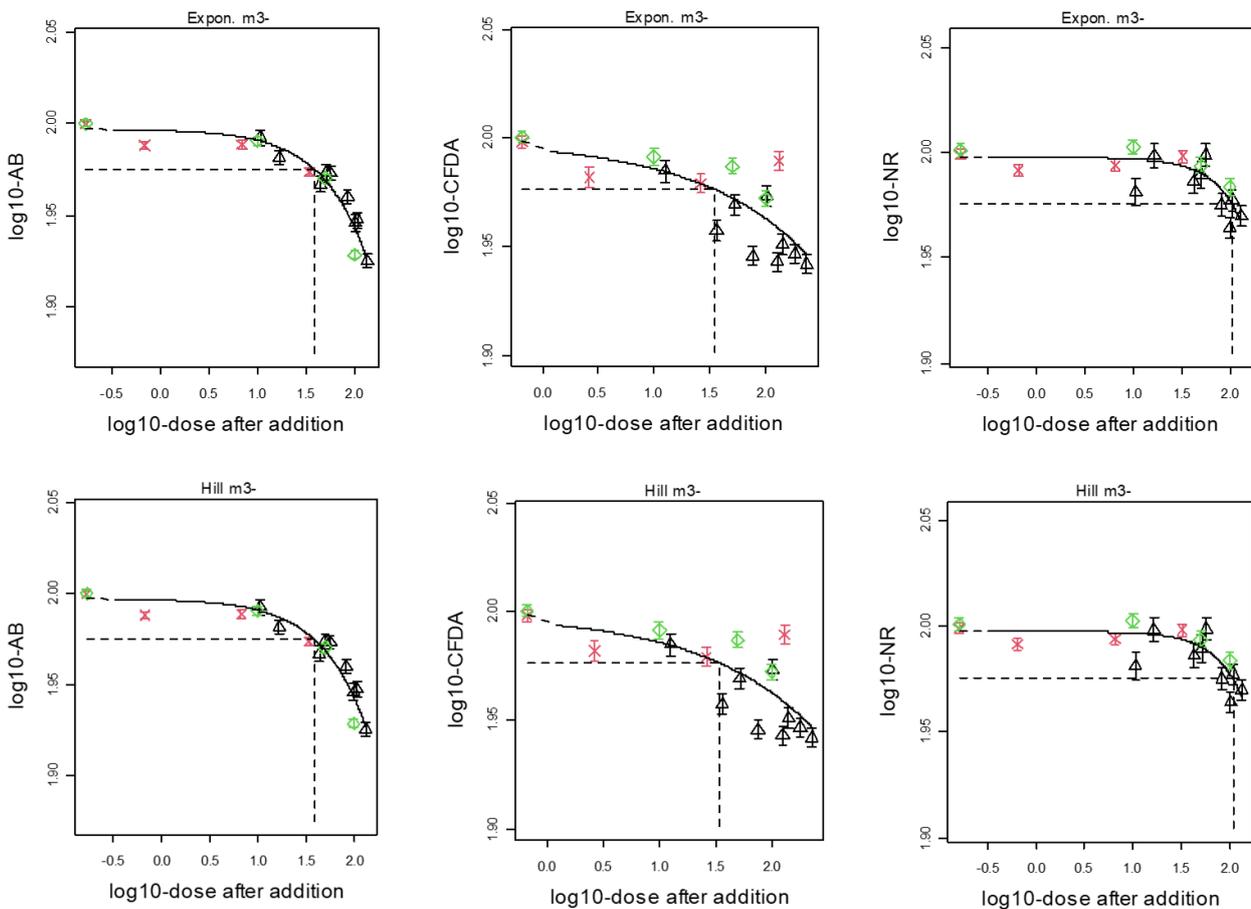


FIGURA 25. Curva dosis-respuesta TBBPA-PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Modelizaciones de Hill y exponenciales empleadas para el cálculo de las BMR tras 24 h de exposición para el AB (izquierda), la CFDA-AM (centro) y RN (derecha). Se indican los valores medios y las DS de las distintas condiciones: mezclas (triángulos negros), PSNPs (cruces rojas) y TBBPA (diamantes verdes).

TABLA 13. Dosis de referencia (BMD) de la combinación TBBPA-PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX tras 24 h de exposición.

			BMD _{inferior}	BMD _{superior}
Caco-2/HT29-MTX	AB	CED-TBBPA	31,10	46,60
		RPF-PSNPs	0,53	0,84
	CFDA-AM	CED-TBBPA	16,80	59,60
		RPF-PSNPs	1,53	6,95
	RN	CED-TBBPA	88,70	128,00
		RPF-PSNPs	0,20	1,14

CED = Dosis crítica efectiva; RFP = Factor de potencia relativa
 Tamaño del efecto crítico (CES = 0,05)

Por lo tanto, los efectos de las combinaciones son desiguales, sin un claro patrón de efecto, no diferenciándose mucho de los efectos que produce el TBBPA de forma individual, ni dependiendo enteramente de la concentración de los PSNPs. Sin embargo, aunque parecen ser más perjudiciales sobre el co-cultivo, las combinaciones de ambos compuestos sugieren tener un efecto relevante a nivel de la membrana plasmática.

Debido a que las combinaciones TBBPA-PSNPs ejercen un mayor efecto sobre el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX, y como este modelo replica de forma más fiel las condiciones fisiológicas *in vivo*, su estudio posee una mayor relevancia a la hora de evaluar los posibles efectos que tengan estas combinaciones. Es por ello por lo que el resto de las aproximaciones experimentales se realizaron empleando el modelo del co-cultivo Caco-2/HT29-MTX.

2.2. Ensayos de toxicidad específica

2.2.1. Evaluación del metabolismo oxidativo

La evaluación del potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi$), así como la generación de ROS, sobre el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX se realizó seleccionando las combinaciones con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSNPs, estudiando sus posibles efectos sobre las concentraciones de TBBPA 10 μM y 100 μM . La selección de dichas concentraciones se basa en las observaciones realizadas previamente en los ensayos de citotoxicidad (Fig. 24), ya que la primera (10 μM TBBPA + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSNPs) mostró efectos perniciosos tanto a nivel metabólico como a nivel de la membrana plasmática, mientras que la segunda (100 μM TBBPA + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSNPs) sólo mostró diferencias sobre la integridad de la membrana, pero ambas combinaciones demuestran ser buenas candidatas para la detección de efectos subcitotóxicos sutiles. De manera adicional, también se estudió la influencia de estas combinaciones mediante Real-Time qRT-PCR, evaluando la expresión de algunos genes de estrés oxidativo, concretamente los genes GSTP1 (glutación S-transferasa pi 1), NRF2 (factor nuclear eritroide similar al factor 2) y SOD2 (superóxido dismutasa 2).

La Fig. 26A, correspondiente a la evaluación de la generación de ROS, refleja diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en la concentración de 100 μM de TBBPA y su combinación con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSNPs, pero no así entre ellos.

Sin embargo, tal y como se aprecia en la Fig. 26B, perteneciente a la medida del potencial de membrana mitocondrial, tanto la condición de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSNPs como las combinaciones de TBBPA-PSNPs, muestran un peculiar aumento en la intensidad de fluorescencia, haciendo que las condiciones en las que se encuentran presentes los PSNPs sean estadísticamente significativas tanto con respecto a sus correspondientes controles de TBBPA como con el propio control en este ensayo. A parte de estas peculiaridades, sólo la condición de 100 μM de TBBPA, así como su combinación, muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

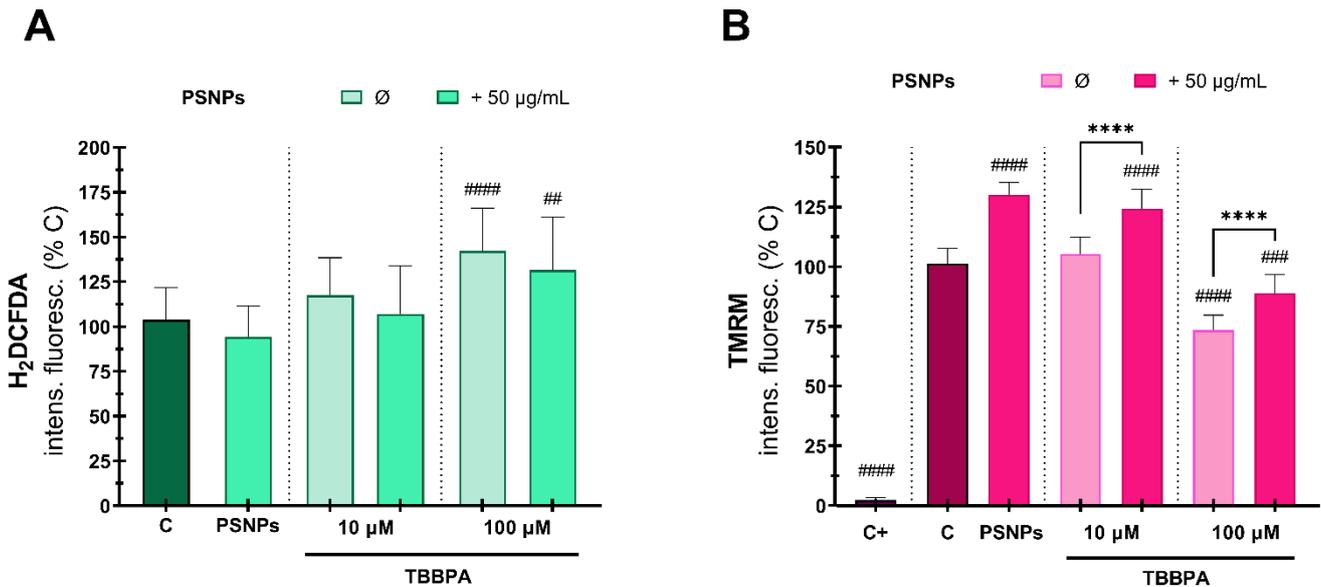


FIGURA 26. Efectos de la combinación TBBPA-PSNPs sobre el metabolismo oxidativo del co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Diagrama de barras (media y DS) para la producción de ROS (A) y el potencial de membrana mitocondrial (B) mediante la sonda H₂DCFDA y el fluorocromo TMRM respectivamente, tras 24 h de exposición. C+: 50 μM de CCCP durante 24 h. Diferencias significativas con respecto a las células control (#), o con respecto a las condiciones individuales de TBBPA (*). Tests de ANOVA de una vía + Dunnett (A) y Brown-Forsythe & Welch ANOVA + Dunnett T3 (B). $p \leq 0,05$. $n=18$, 3 experimentos independientes.

En cuanto a la expresión génica (Fig. 27), se puede apreciar que, aunque no se detectan diferencias estadísticamente significativas en el gen GSTP1, tanto en SOD2 como en NRF2 sí que se observa un aumento significativo en la expresión relativa (RQ) al comparar la combinación 10 μM TBBPA + 50 $\mu\text{g/mL}$ PSNPs con la concentración de TBBPA individual, así como con el control en el caso del gen NRF2, lo que sugiere que esta combinación desencadena una respuesta frente a estrés oxidativo.

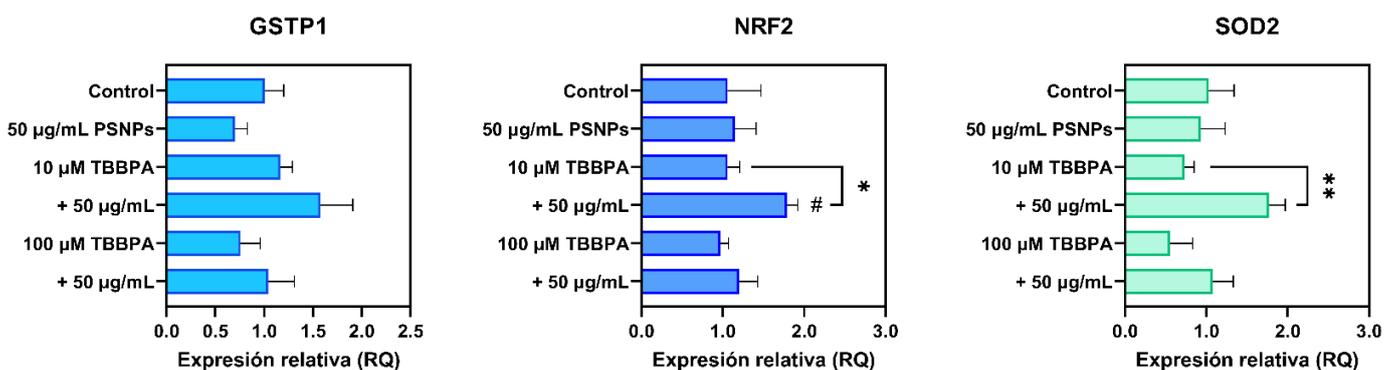


FIGURA 27. Cambios en la expresión de genes de estrés oxidativo en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Diagrama de barras (media y DS) reflejando la expresión relativa (RQ) obtenida mediante Real-Time qRT-PCR para GSTP1 (izquierda), NRF2 (centro) y SOD2 (derecha) tras exposición durante 24 h a distintos tratamientos de TBBPA-PSNPs. Diferencias estadísticamente significativas respecto al control (#) o con respecto a las condiciones individuales de TBBPA (*). Test de ANOVA de una vía + Šidák. $p \leq 0,05$. $n=3$ experimentos independientes.

2.2.2. Evaluación de la genotoxicidad

La evaluación de los efectos genotóxicos de las combinaciones TBBPA-PSNPs se realizó tanto mediante el ensayo Cometa como por Real-Time qRT-PCR. En el primer caso, y al igual que anteriormente (Parte 1. Sección

1.2.2.), se emplearon el ensayo alcalino, así como el modificado con la enzima FPG. Para la evaluación de la expresión génica, se escogieron los siguientes genes relacionados con la reparación del daño al ADN: ATM (ataxia telangiectasia mutada), ATR (proteína relacionada con ataxia telangiectasia y Rad3), PARP1 (Poli (ADP-ribosa) Polimerasa 1) y OGG1 (8-oxoguanina ADN glicosilasa 1).

El ensayo Cometa reveló que la combinación de estos compuestos aumenta significativamente el número de roturas en la cadena de ADN, viéndose en las dos combinaciones de estudio (Fig. 28A) pero no en las condiciones individuales. Paradójicamente, la evaluación de la presencia de daños provocados por estrés oxidativo en el ADN mediante la enzima FPG (Fig. 28B), muestra diferencias estadísticamente significativas únicamente en la condición de 100 μM TBBPA y su combinación con respecto al control, no viéndose efectos en el resto de las condiciones al ser comparadas con sus correspondientes tratamientos individuales. Por otro lado, se observan diferencias significativas entre las condiciones individuales de TBBPA entre sí.

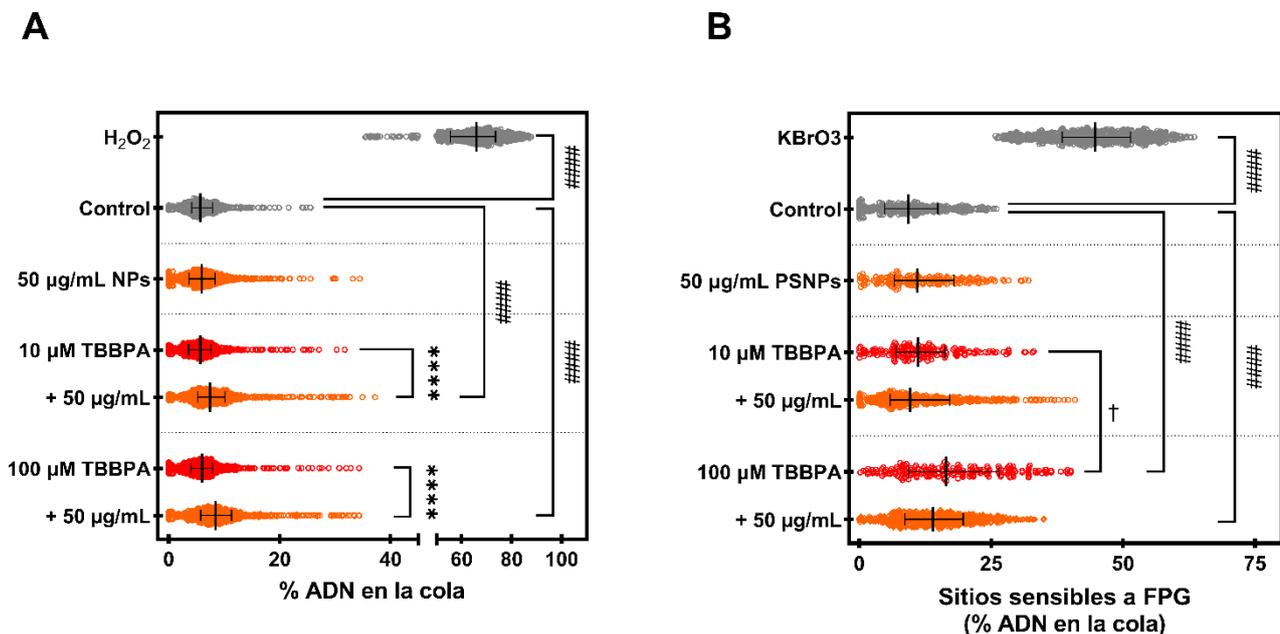


FIGURA 28. Genotoxicidad de la combinación TBBPA-PSNPs, así como por separado, en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Resultados del ensayo Cometa mostrando el % de ADN en la cola tanto en el procedimiento alcalino (A) como en la modificación con la enzima FPG (B), tras la exposición durante 24 h. Representación de dispersión de puntos en la que se incluyen la mediana (línea) y el rango intercuartílico de 3 experimentos independientes. *: diferencias estadísticamente significativas frente a las condiciones de TBBPA individuales ($p \leq 0,05$); #: diferencias estadísticamente significativas frente al control ($p \leq 0,05$). †: diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre 10 μM y 100 μM de TBBPA. Test de Kruskal – Wallis + Dunn. 3 experimentos independientes.

La evaluación de la expresión génica (Fig. 29) muestra diferencias estadísticamente significativas en la combinación 10 μM TBBPA + 50 $\mu\text{g/mL}$ PSNPs en todos los genes estudiados, a excepción de PARP1. Esta combinación muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición de TBBPA individual en ATM, ATR y OGG1, mostrándolas además respecto al control en este último caso. Por ello, se puede deducir que esta combinación ejerce un efecto dañino sobre la cadena de ADN que no es observado al evaluar los efectos del TBBPA de forma individual.

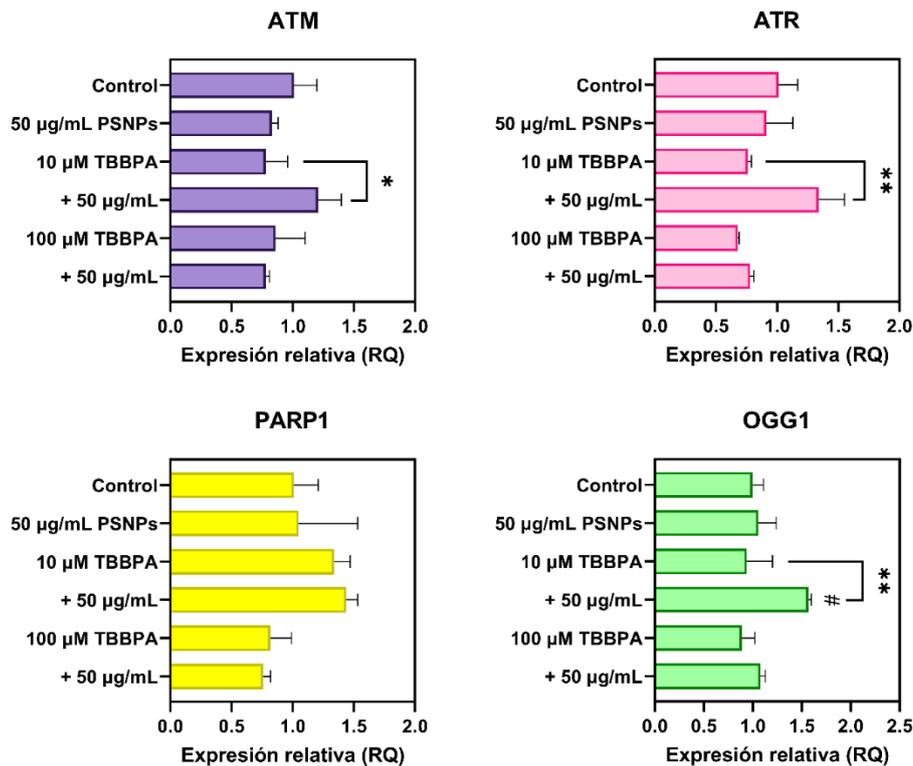


FIGURA 29. Evaluación de los cambios en la expresión génica mediante Real-Time qRT-PCR en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Resultados mostrando la expresión relativa (RQ) de las diferentes combinaciones de TBBPA-PSNPs, así como por separado, al evaluar diferentes genes relacionados con reparación del daño al ADN durante 24 h. Diagrama de barras mostrando la media y la DS de 3 experimentos independientes. #: diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al control; *: diferencias con respecto a las condiciones de TBBPA individuales. †: diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre 10 μM y 100 μM de TBBPA. Test de ANOVA de una vía + Šidák. ($p \leq 0,05$).

Parte 3. Evaluación de la toxicidad del TBBPA y los PSNPs sobre sistemas celulares fisiológicamente relevantes

3.1. Estudio de la citotoxicidad basal

Para la evaluación de los compuestos durante exposiciones prolongadas, se empleó el modelo del co-cultivo Caco-2/HT29-MTX, que ofrece una mayor relevancia fisiológica *in vivo*, y, en los estudios previos, ha evidenciado características diferenciales frente a los cultivos individuales y mayor susceptibilidad a los tratamientos combinados.

Se evaluó el potencial toxicológico de los compuestos de estudio sobre el modelo del co-cultivo durante 21 d, el tiempo requerido para el proceso de diferenciación de la línea Caco-2, para comprobar los posibles efectos que tienen los compuestos tras una exposición prolongada.

3.1.1. Efectos del TBBPA

Para evaluar el efecto del TBBPA sobre el co-cultivo se empleó la misma metodología mencionada anteriormente exceptuando la medida del RN, ya que el procesamiento implicaba cierta pérdida de adhesión celular y, por lo tanto, los resultados obtenidos no reflejaban de forma fidedigna la integridad lisosomal.

Las concentraciones evaluadas fueron las mismas que se seleccionaron para la determinación de los efectos de las combinaciones durante 24 h (10, 50 y 100 μM de TBBPA).

Como se observa en la Fig. 30, tras 21 d de exposición, sólo se aprecian diferencias estadísticamente significativas a partir de la concentración más elevada (100 μM), lo que indica que el TBBPA no parece afectar ni a la actividad metabólica ni a la de la membrana plasmática de la misma forma en la que lo hacía a 24 h.

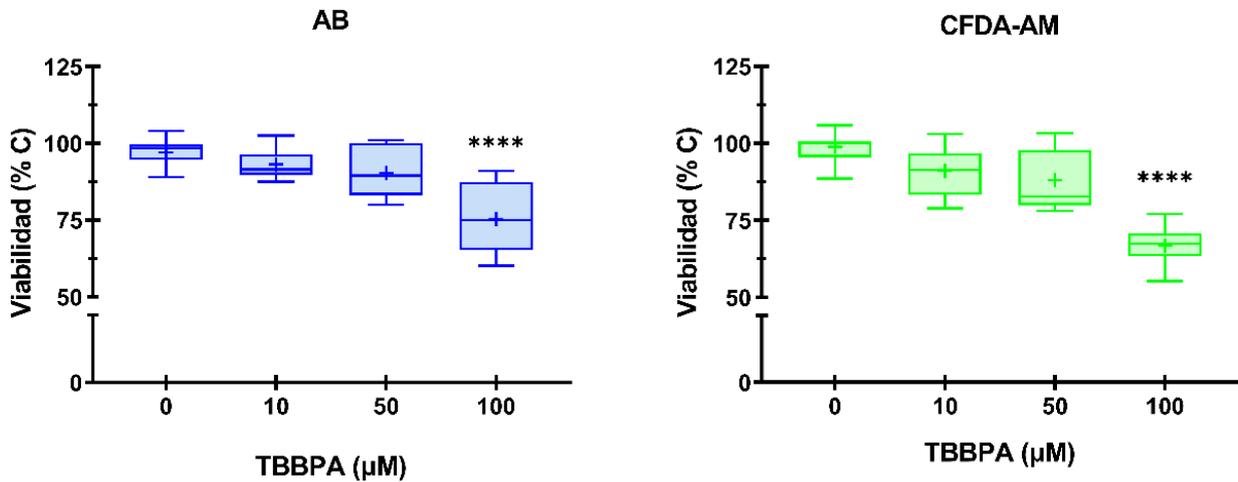


FIGURA 30. Citotoxicidad del TBBPA en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Evaluación del AB y la CFDA-AM tras 21 d de exposición. Gráficas de cajas y bigotes mostrando la media (+), la mediana (línea), rango intercuartílico (límites de la caja) y los valores máximo y mínimo (bigotes). Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en comparación con el grupo control tras los tests Brown – Forsythe & Welch + Dunnett T3 (AB) y de Kruskal-Wallis + Dunn (CFDA-AM). $n=18$, 3 experimentos independientes.

Las BMDs (Tabla 14) muestran que la exposición prolongada al TBBPA no parece perjudicar notoriamente la integridad celular de forma general; de hecho, estos valores son superiores a 75 μM en ambas evaluaciones, corroborando lo reflejado en la Fig. 30.

TABLA 14. Dosis de referencia (BMD) del TBBPA en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX tras 21 d de exposición.

		BMD _{inferior}	BMD _{superior}
Caco-2/HT29-MTX	AB	76,90	100,00
	CFDA-AM	96,70	-

Tamaño del efecto crítico (CES = 0,05)

(-): valores fuera del rango de dosis

3.1.2. Efectos de los PSNPs

Como en el caso del TBBPA, se seleccionaron tres concentraciones específicas (1, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSNPs) para determinar los efectos citotóxicos de los PSNPs en función de los resultados obtenidos tras la evaluación de sus efectos a 24 h.

En este caso, la Fig. 31 muestra cómo se detectan diferencias significativas tanto sobre la actividad metabólica como sobre la integridad de la membrana plasmática en la concentración más elevada (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No obstante, los valores de viabilidad se mantuvieron en torno (AB) o por encima (CFDA-AM) del 75%.

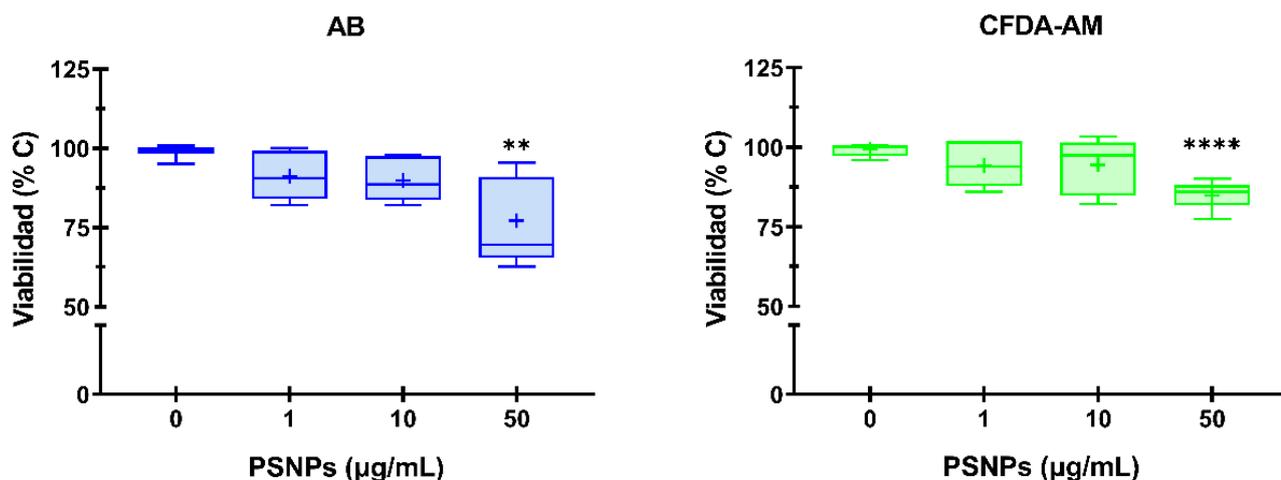


FIGURA 31. Citotoxicidad de los PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Evaluación del AB y la CFDA-AM tras 21 d de exposición. Gráficas de cajas y bigotes mostrando la media (+), la mediana (línea), rango intercuartílico (límites de la caja) y los valores máximo y mínimo (bigotes). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en relación con el grupo control tras los tests de Brown-Forsythe & Welch ANOVA + Dunnett T3. $n=15$, 3 experimentos independientes.

3.1.3. Efecto de de las combinaciones TBBPA-PSNPs

La evaluación de los efectos de la combinación TBBPA-PSNPs durante 21 d se realizó en las mismas condiciones empleadas para los estudios de 24 h. La Fig. 32 muestra los efectos de las diferentes combinaciones sobre el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX, evidenciando que las tres combinaciones realizadas con 10 μM de TBBPA muestran diferencias significativas con respecto a éste únicamente para la actividad metabólica. Por otra parte, ninguna otra combinación mostró diferencias significativas con respecto a sus correspondientes controles de TBBPA.

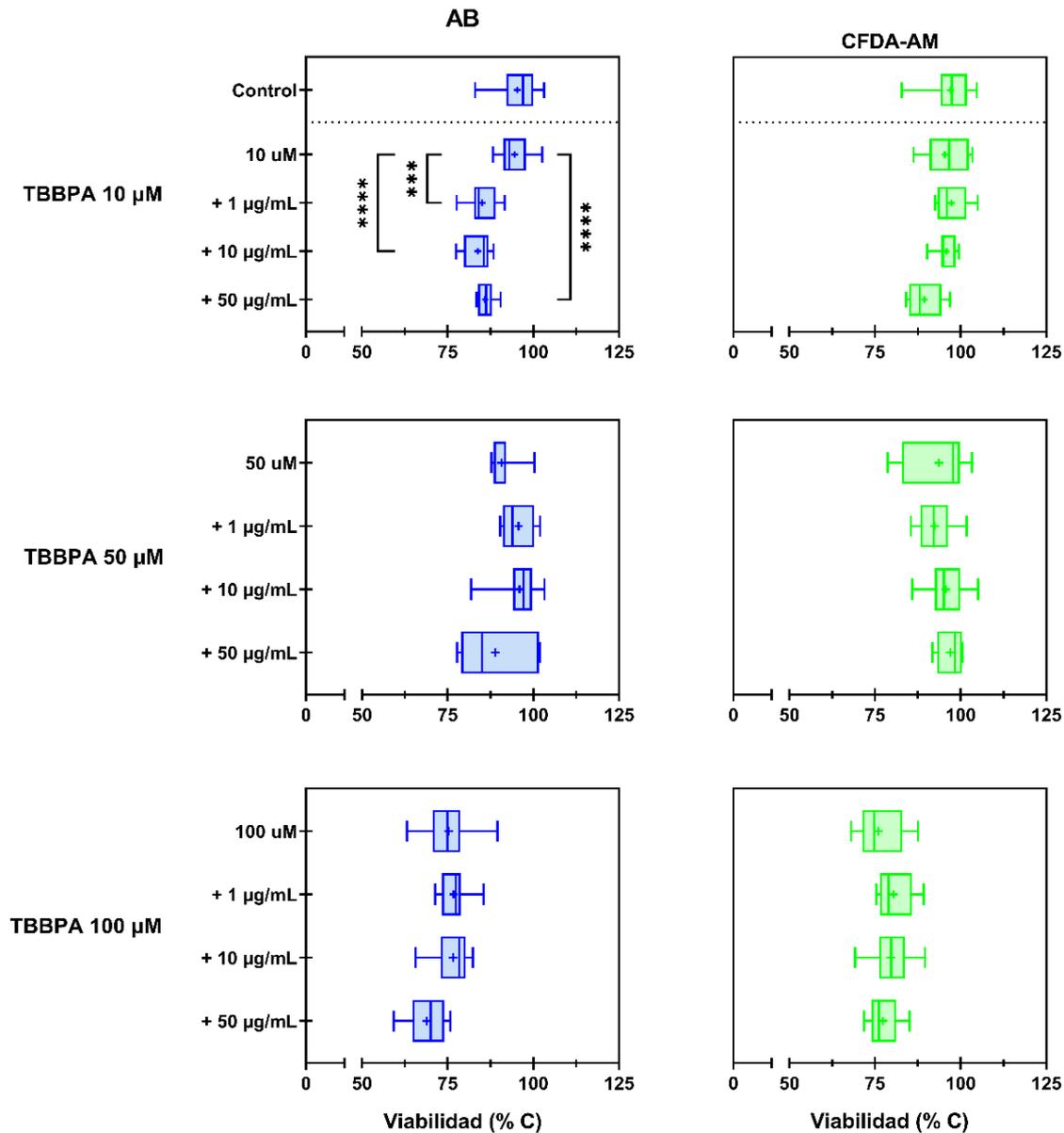


FIGURA 32. Citotoxicidad de la combinación del TBBPA y los PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Evaluación del AB y la CFDA-AM tras 21 d de exposición. Gráficas de cajas y bigotes mostrando la media (+), la mediana (línea), rango intercuartílico (límites de la caja) y los valores máximo y mínimo (bigotes). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) de las posibles combinaciones vs. la exposición individual al TBBPA tras los tests Brown-Forsythe & Welch ANOVA + Dunnett T3 (AB) y Kruskal-Wallis + Dunn. $n=15$, 3 experimentos independientes.

La evaluación de las BMDs muestra que la influencia de los PSNPs al encontrarse en combinación con el TBBPA es baja, y que parece tener un efecto ligeramente más acusado sobre la actividad metabólica (Fig. 33, Tabla 15). No obstante, en general, los efectos observados se deben principalmente al potencial citotóxico del TBBPA.

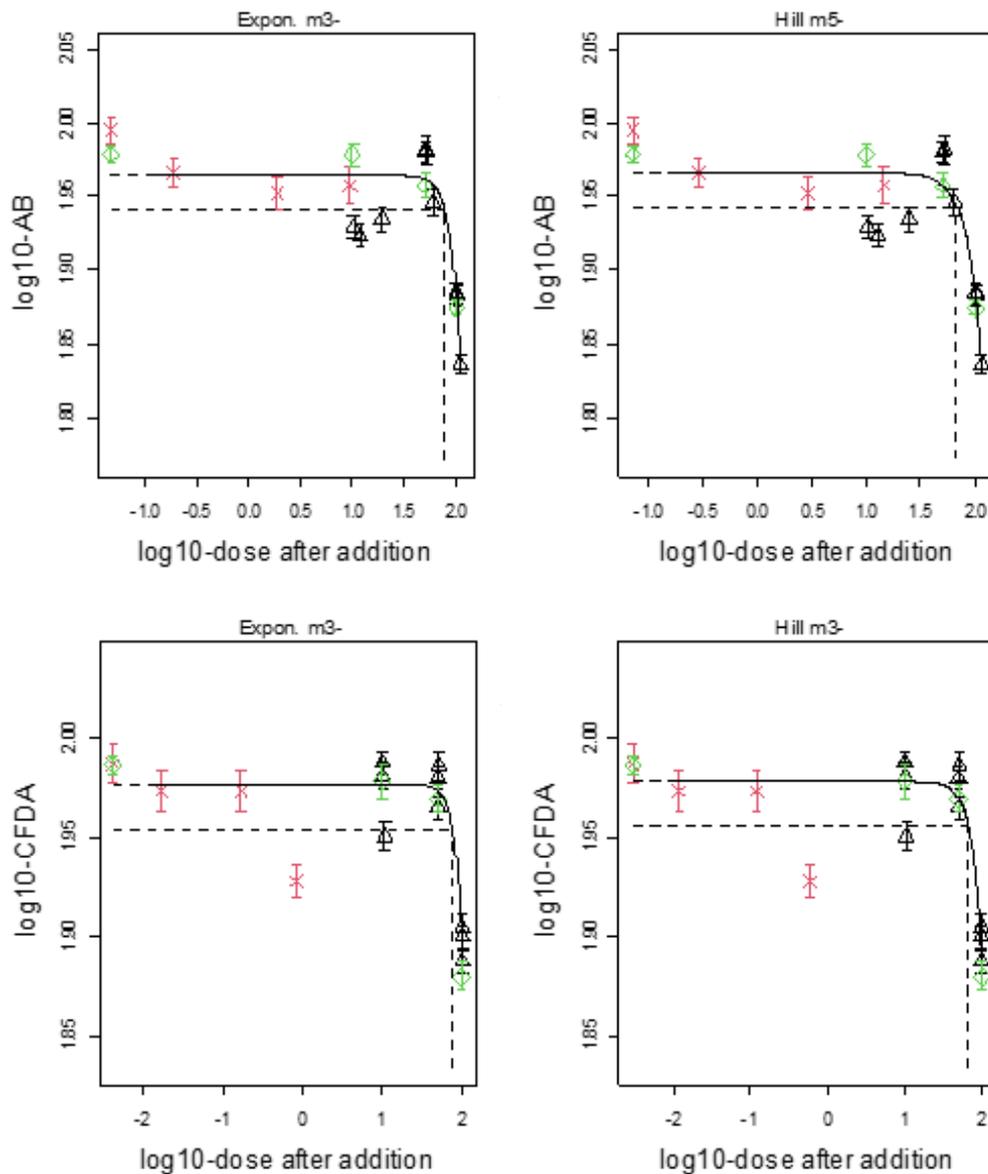


FIGURA 33. Curva dosis-respuesta TBBPA-PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Modelizaciones de Hill y exponenciales empleadas para el cálculo de las BMR tras 21 d de exposición para el AB (arriba) y la CFDA-AM (abajo). Se indican los valores medios y las DS de las distintas condiciones: mezclas (triángulos negros), PSNPs (cruces rojas) y TBBPA (diamantes verdes).

TABLA 15. Dosis de referencia (BMD) de la combinación TBBPA-PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX tras 21 d de exposición.

			BMD _{inferior}	BMD _{superior}
Caco-2/HT29-MTX	AB	CED-TBBPA	62,50	79,20
		RPF-PSNPs	0,12	0,46
	CFDA-AM	CED-TBBPA	60,80	78,70
		RPF-PSNPs	0,00	0,13

CED = Dosis crítica efectiva; RFP = Factor de potencia relativa
 Tamaño del efecto crítico (CES = 0,05)

3.2. Ensayos de toxicidad específica

3.2.1. Evaluación del metabolismo oxidativo

Para la evaluación del metabolismo oxidativo en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX, se estudiaron los efectos de las combinaciones mediante Real-Time qRT-PCR, evaluando la expresión de los mismos genes relacionados con los procesos de estrés oxidativo empleados en la evaluación a 24 h. Se seleccionaron las combinaciones de TBBPA 10 y 100 μ M y de PSNPs 1 y 50 μ g/mL en función de lo observado previamente, tanto a 24 h como tras la exposición prolongada.

En este caso, sorprendentemente, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las condiciones evaluadas en los tres genes seleccionados (Fig. 34). Sin embargo, parece darse una tendencia generalizada por la cual la concentración más elevada de TBBPA (100 μ M) así como sus respectivas combinaciones, provocan un mayor nivel de activación de estos genes, siendo fuertemente acusado en el gen GSTP1. En el caso del gen SOD2, puede apreciarse este efecto especialmente en las combinaciones estudiadas, destacando la combinación 10 μ M de TBBPA + 50 μ g/mL.

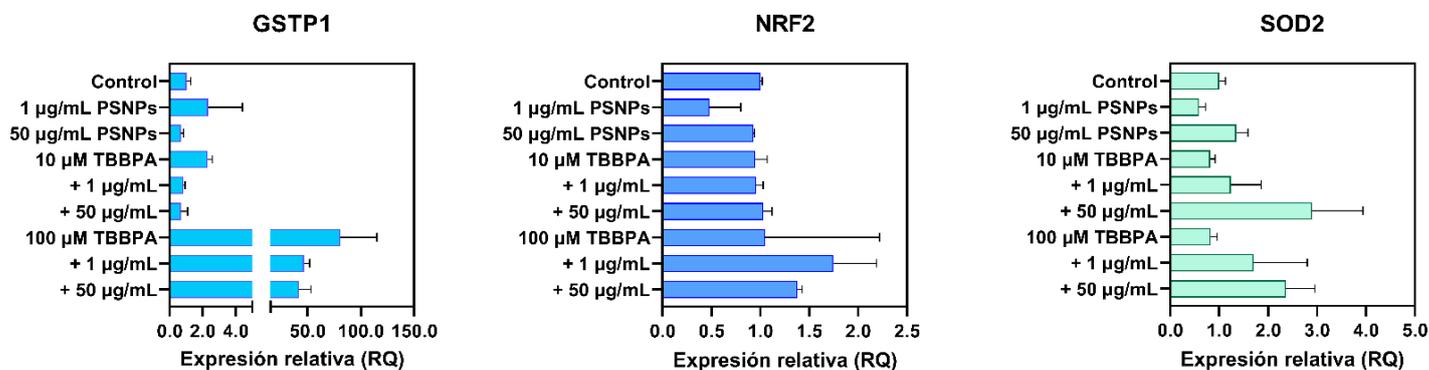


FIGURA 34. Evaluación de los cambios en la expresión génica mediante Real-Time qRT-PCR en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Resultados mostrando la expresión relativa (RQ) de las diferentes combinaciones de TBBPA-PSNPs, así como por separado, al evaluar diferentes genes relacionados con procesos de estrés oxidativo tras su exposición prolongada durante 21 d. Diagrama de barras mostrando la media y la DS de 2 experimentos independientes. Test de Brown-Forsythe & Welch + Dunnett T3 (SOD2) y Kruskal – Wallis + Dunn (GSTP1 y NRF2).

3.2.2. Evaluación de la genotoxicidad

La evaluación de los efectos genotóxicos de la combinación TBBPA-PSNPs se realizó mediante el ensayo Cometa y su variante con la enzima FPG, así como mediante la evaluación de genes relacionados con daño al ADN mediante Real-Time qRT-PCR.

Para la evaluación del potencial genotóxico de las combinaciones durante su exposición prolongada, se seleccionaron las mismas concentraciones empleadas en la evaluación del metabolismo oxidativo (10 y 100 μ M de TBBPA, 1 y 50 μ g/mL de PSNPs).

En el ensayo de Cometa alcalino sólo se pudo apreciar un aumento de roturas en el ADN significativo con respecto a la condición individual de TBBPA en la combinación de 100 μ M TBBPA + 50 μ g/mL PSNPs (Fig. 35A). Sin embargo, el ensayo con FPG muestra un elevado daño oxidativo en las dos combinaciones con 10 μ M de TBBPA (Fig. 35B), claramente significativas con respecto a la condición de TBBPA por separado. Por otro lado, se vuelve a confirmar la influencia que tiene la condición de 100 μ M de TBBPA sobre la generación de daño oxidativo en el ADN, así como las diferencias existentes entre las dos condiciones individuales de TBBPA.

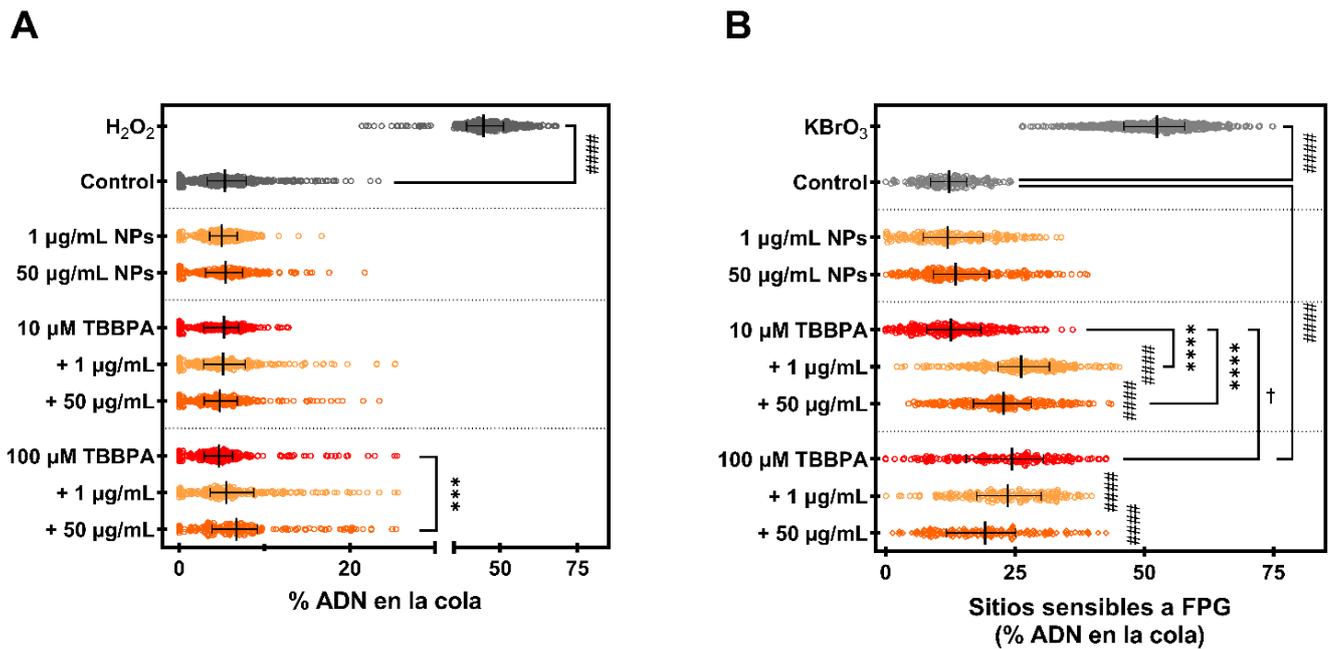


FIGURA 35. Genotoxicidad de las combinaciones y tratamientos individuales de TBBPA y PSNPs en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Resultados del ensayo Cometa mostrando el % de ADN en la cola tanto en el procedimiento alcalino (A) como en la modificación con la enzima FPG (B), tras la exposición durante 21 d. Representación de dispersión de puntos en la que se incluyen la mediana y el rango intercuartílico de 3 experimentos independientes. Diferencias estadísticamente significativas frente a las condiciones de TBBPA individuales (*, $p \leq 0,05$); frente a las células control sin tratar (#, $p \leq 0,05$) y entre 10 µM y 100 µM de TBBPA (†; $p \leq 0,05$). Test de Kruskal – Wallis + Dunn.

Por otro lado, la evaluación de los cambios en la expresión génica de las condiciones experimentales seleccionadas no reveló diferencias significativas en ninguno de los genes de estudio, tal y como se muestra en la Fig. 36, excepto en la condición de 50 µg/mL de PSNPs con respecto al control en el gen ATR. Por otro lado, tal y como ocurría con los genes relacionados con el estrés oxidativo, se da una tendencia ascendente en la condición de 100 µM de TBBPA y sus combinaciones en la expresión de los genes ATR y PARP1.

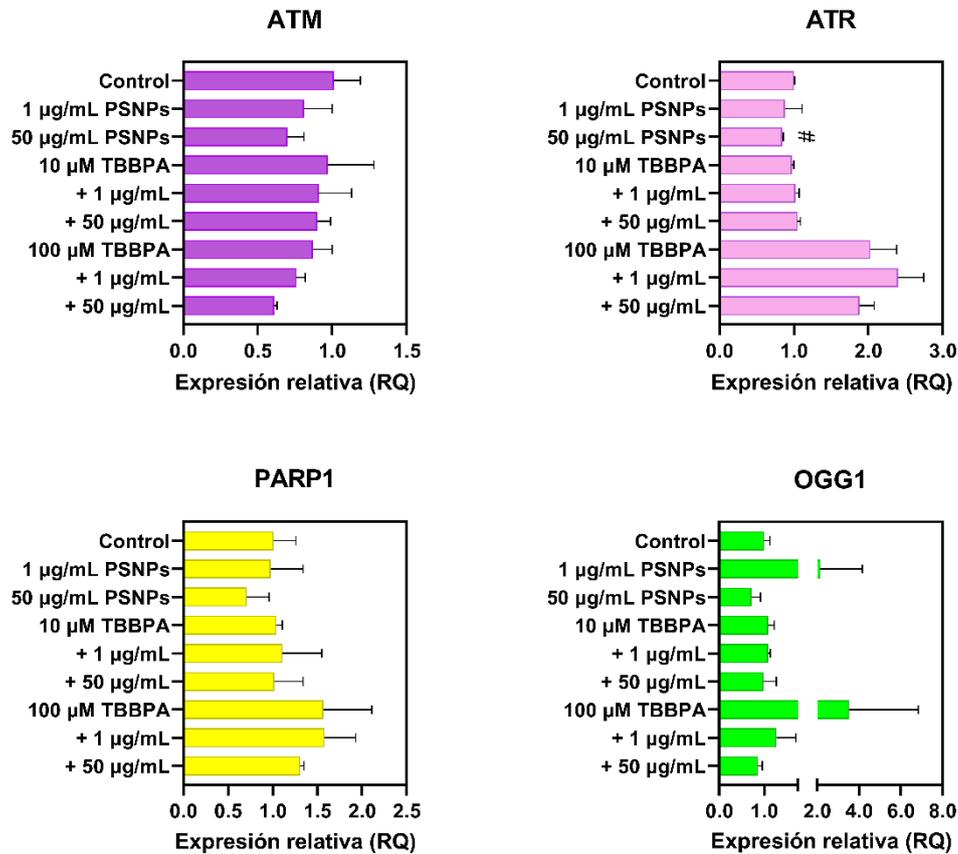


FIGURA 36. Evaluación de los cambios en la expresión génica mediante Real-Time qRT-PCR en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Resultados mostrando la expresión relativa (RQ) de las diferentes combinaciones de TBBPA-PSNPs, así como por separado, al evaluar diferentes genes relacionados con daño al ADN tras su exposición durante 21 d. Diagrama de barras mostrando la media y la DS de 2 experimentos independientes. Test de Brown-Forsythe & Welch + Dunnett T3 (ATM, ATR y PARP1) y Kruskal – Wallis + Dunn (OGG1).

Para comprobar si las diferentes condiciones experimentales seleccionadas ejercían algún efecto sobre las células una vez ya diferenciadas, se evaluaron algunos genes relevantes, los cuales se expresan únicamente en estas células una vez ya diferenciadas: TJP1 (proteína de uniones estrechas 1), ABCB1 (transportador dependiente de ATP, subfamilia B miembro 1) y ALPI (fosfatasa alcalina intestinal).

Los cambios en la expresión génica no mostraron diferencias significativas en ninguno de los genes seleccionados, a excepción de la combinación 100 μM de TBBPA + 1 μg/mL de PSNPs en la expresión del gen ABCB1, mostrando un aumento (Fig. 37). A pesar de no resultar significativos, también se aprecia que tanto 100 μM de TBBPA, como su combinación con 50 μg/mL de PSNPs, muestran igualmente este aumento en la expresión génica de ABCB1. En el caso de ALPI, se puede apreciar en que todas las combinaciones TBBPA-PSNPs analizadas, tanto en las de 10 μM como en las de 100 μM de TBBPA, parece darse una menor expresión génica de este gen. En TPJ1, la concentración de 50 μg/mL de PSNPs parece ejercer un cierto efecto negativo en la expresión de dicho gen, interfiriendo en la formación de uniones estrechas en estas células.

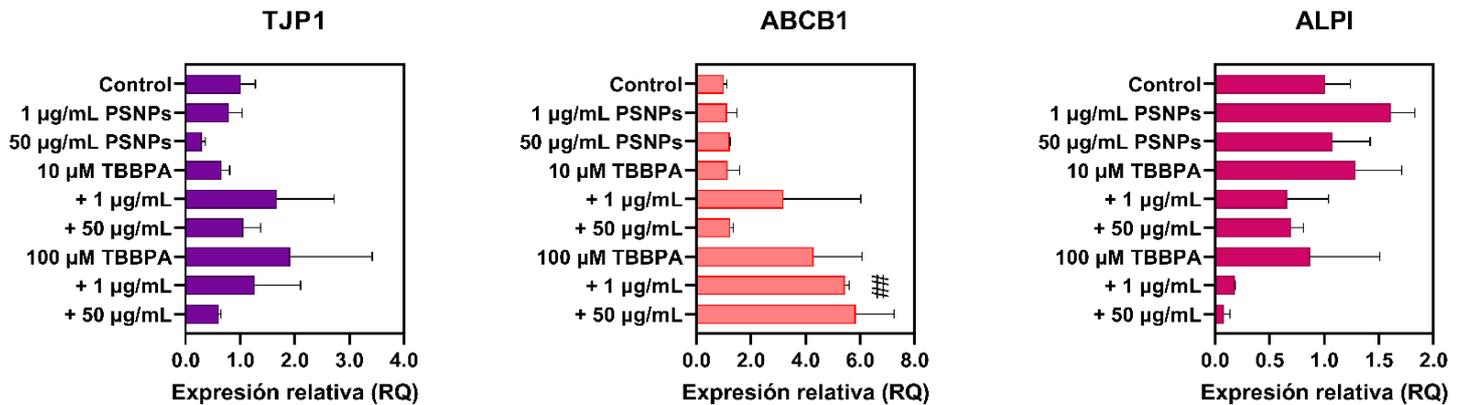


FIGURA 37. Evaluación de los cambios en la expresión génica mediante Real-Time qRT-PCR en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Resultados mostrando la expresión relativa (RQ) de las diferentes combinaciones de TBBPA-PSNPs, así como por separado, al evaluar diferentes genes presentes en células diferenciadas tras su exposición durante 21 d. Diagrama de barras mostrando la media y la DS de 2 experimentos independientes. Test de Brown-Forsythe & Welch + Dunnett T3.

3.3. Evaluación morfológica de las células intestinales diferenciadas

Por otro lado, la evaluación de la morfología celular se realizó tras el mantenimiento de las células empleando insertos *transwell* durante los 21 d necesarios para que las células Caco-2 desarrollen un fenotipo enterocítico.

A continuación, se procedió a realizar la exposición durante 24 h de las combinaciones 10 µM de TBBPA + 1 µg/mL de PSNPs y 10 µM de TBBPA + 50 µg/mL de PSNPs respectivamente. Para microscopía confocal, se utilizó una versión fluorescente de los PSNPs (F-PSNPs), con las mismas características que los empleados en el resto de aproximaciones experimentales.

La evaluación de las células mediante microscopía confocal se realizó para determinar si las células presentaban alguna alteración notable sobre la morfología celular general como consecuencia de la exposición a las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs, así como para comprobar si los F-PSNPs eran capaces de internalizarse en las células.

Las imágenes obtenidas muestran que las células no tratadas poseen una morfología celular normal, con núcleos de diferentes tamaños y microfilamentos de actina bien organizados delimitando la periferia celular. Estos microfilamentos les confieren a las células formas irregulares, vislumbrándose incluso algunas formas pentagonales y/o hexagonales (Fig. 38). En el caso de las células tratadas, la morfología celular no parece verse afectada por la presencia de las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs, ya que la disposición de los microfilamentos es similar a la observada en las células control. Sí que se aprecia que, en las dos condiciones, los PSNPs son capaces de acumularse rápidamente en el interior de las células tras estas exposiciones agudas. Esto es especialmente notable en la condición de 10 µM de TBBPA + 50 µg/mL de PSNPs, ya que se aprecia que estos últimos llegan a acumularse en el interior de múltiples vesículas endocíticas.

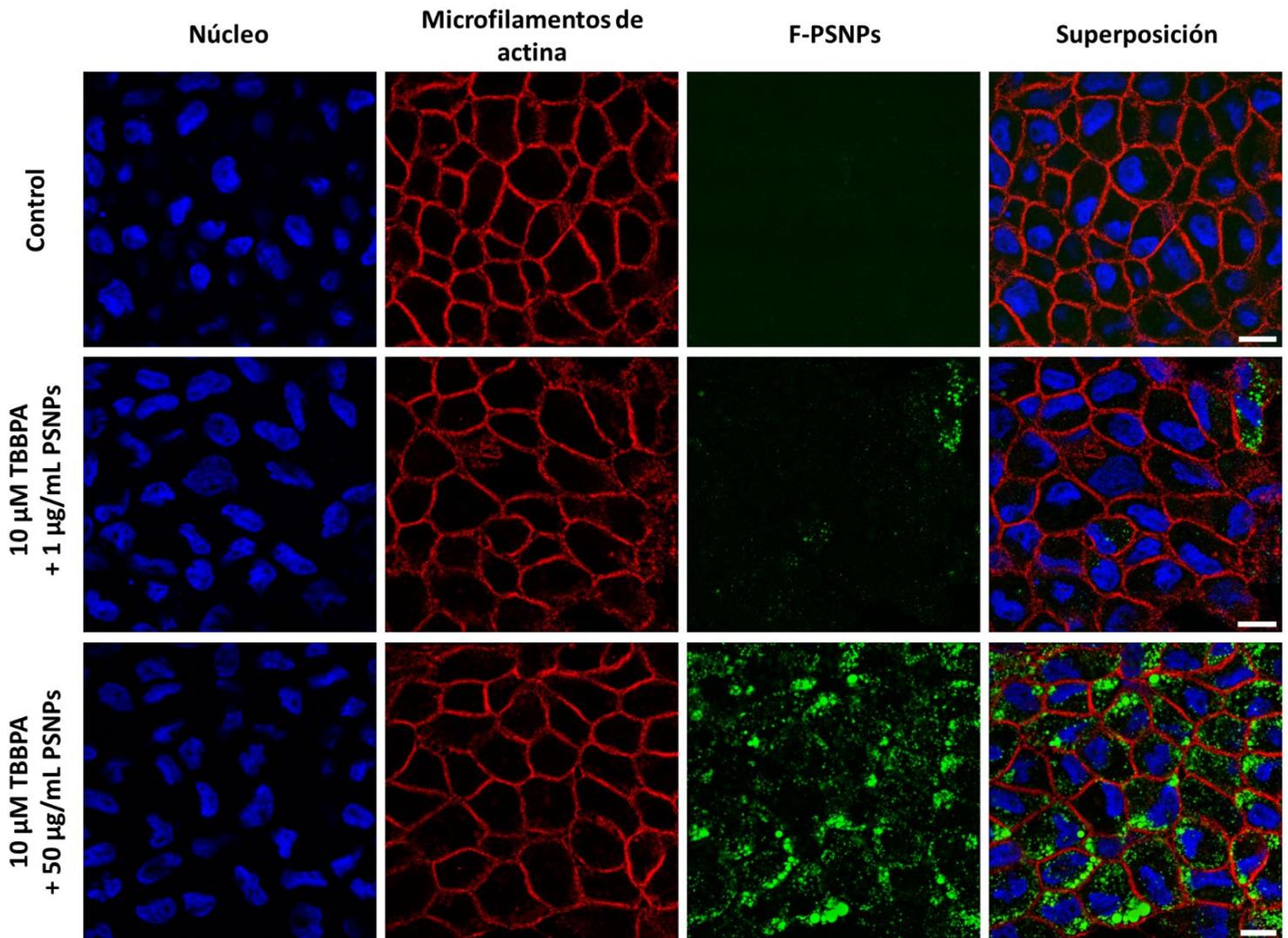


FIGURA 38. Evaluación morfológica de las Caco-2 diferenciadas mediante microscopía confocal. Imágenes representativas de la morfología celular y la internalización de los PSNPs fluorescentes (F-PSNPs) en las Caco-2 al evaluar las diferentes condiciones de estudio. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) y los microfilamentos de actina con faloidina-Alexa Fluor 546 (rojo), mientras que los F-PSNPs (505/515 nm) se muestran en verde. Barra de escala: 20 μ m.

Para corroborar que las células se encontraban diferenciadas y, por tanto, presentaban una morfología similar a la de los enterocitos intestinales, se evaluaron mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Por otro lado, también se examinó el estado del compartimento endosomal para corroborar lo observado previamente en la evaluación mediante microscopía confocal, así como la posible existencia de otras alteraciones en estas células.

En las imágenes obtenidas mediante MET (Fig. 39), se ha analizado el estado celular general, correspondiente a la primera columna; la existencia de uniones estrechas entre células adyacentes (si las hubiese),

correspondiente a la segunda; y, por último, en la tercera columna se muestran algunos de los orgánulos presentes en el citoplasma celular, concretamente las mitocondrias, con más detalle.

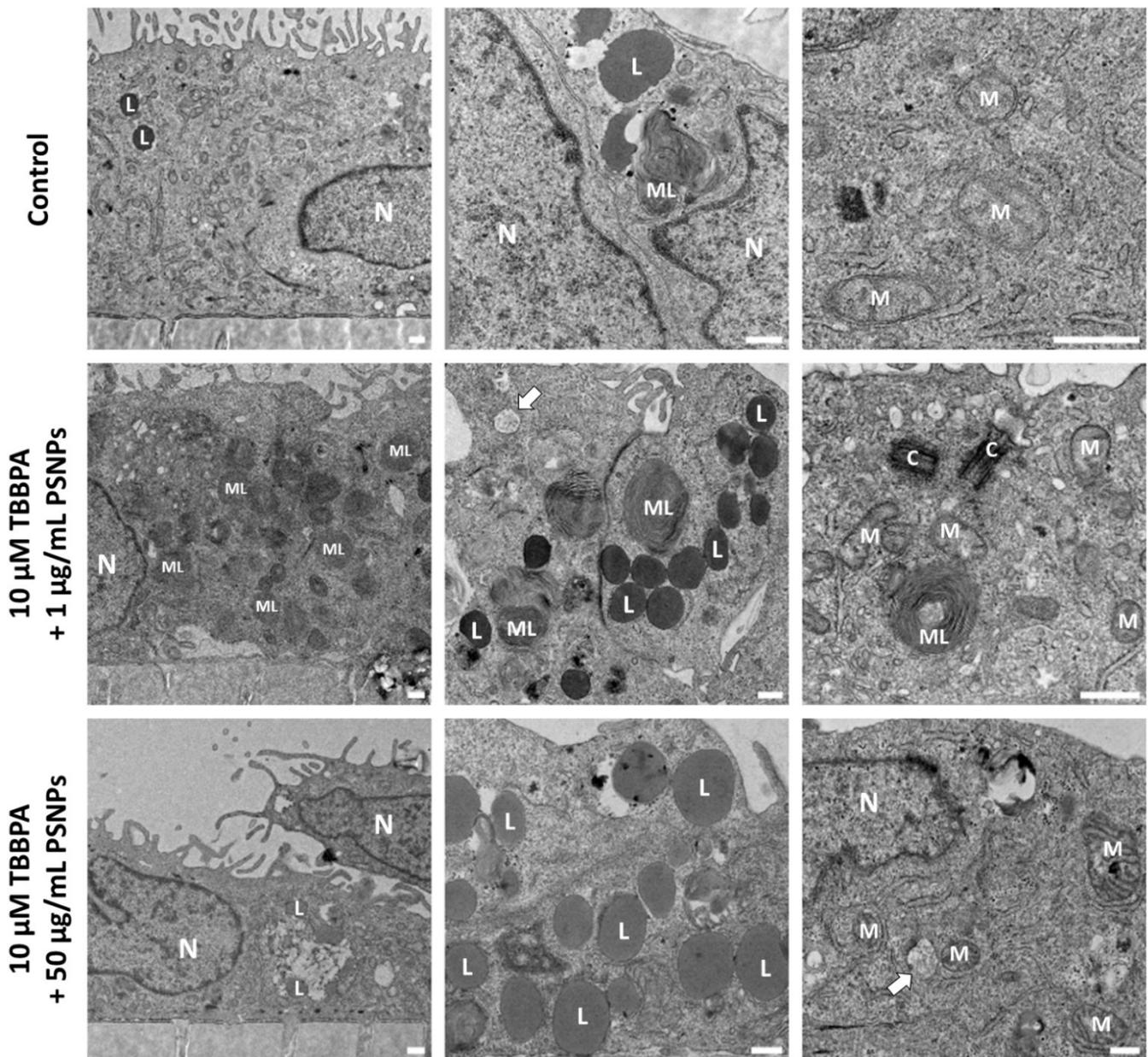


FIGURA 39. Evaluación morfológica de las Caco-2 diferenciadas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Imágenes reflejando la morfología celular de las Caco-2 en las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs seleccionadas. N: núcleo. ML: cuerpo multilamelar. L: lisosoma. M: mitocondria. C: centriolo. Flecha blanca: cuerpo multivesicular. Barra de escala: 0,5 μm.

En dicha figura puede observarse cómo las células no tratadas se encuentran diferenciadas, presentando una morfología compatible con la de los enterocitos. Estas células se encuentran polarizadas, con microvellosidades en la zona apical y, se puede observar la existencia de uniones estrechas entre las células adyacentes. Se aprecia la existencia de algunos lisosomas en el citoplasma celular, así como mitocondrias con crestas mitocondriales definidas de número variable.

Sin embargo, al evaluar las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs (Fig. 39), se pueden observar efectos perceptibles y notables sobre el estado celular. Tanto en la combinación 10 μ M de TBBPA + 1 μ g/mL como en la de 10 μ M de TBBPA + 50 μ g/mL se aprecia un aumento tanto de lisosomas como de endosomas, así como la presencia de cuerpos multivesiculares.

Además, en la combinación 10 μ M de TBBPA + 1 μ g/mL de PSNPs aparecen un notable número de cuerpos multilamelares así como de lisosomas. No obstante, se siguen detectando uniones estrechas e interdigitaciones entre las células adyacentes, así como mitocondrias con una morfología similar a la de las células no tratadas, por lo que esta combinación parece tener efectos sobre la actividad de las vías de degradación y/o reciclaje de los componentes celulares.

En la otra combinación evaluada (10 μ M de TBBPA + 50 μ g/mL de PSNPs) parece haber un mayor número de endosomas que en comparación con la otra mezcla. En el material observado no se han localizado uniones estrechas claramente definidas entre las células, lo que podría sugerir que, a esta concentración, los PSNPs serían capaces de perturbar la integridad de la barrera intestinal de alguna forma. Al igual que lo que ocurría en la combinación 10 μ M de TBBPA + 1 μ g/mL de PSNPs, la morfología mitocondrial parece no verse afectada y ser similar a la observada en las células control.

Por otro lado, el análisis mediante MET nos permitió evidenciar la presencia de partículas internalizadas en diferentes vesículas (Fig. 40), las cuales son compatibles en tamaño y forma con la caracterizada previamente para los PSNPs, tal y como se puede deducir al compararlas con la barra de escala (0,04 μ m).

En el caso de la condición 10 μ M de TBBPA + 1 μ g/mL de PSNPs (Figs. 40A y B), éstas se encuentran generalmente en torno a elementos del compartimento endosomal, concretamente próximas a los cuerpos multivesiculares. En el caso de 10 μ M de TBBPA + 50 μ g/mL de PSNPs (Figs. 40C y D), éstas son mucho más numerosas que las presentes en la otra combinación y se pueden localizar integradas en estructuras membranosas junto a cuerpos multilamelares.

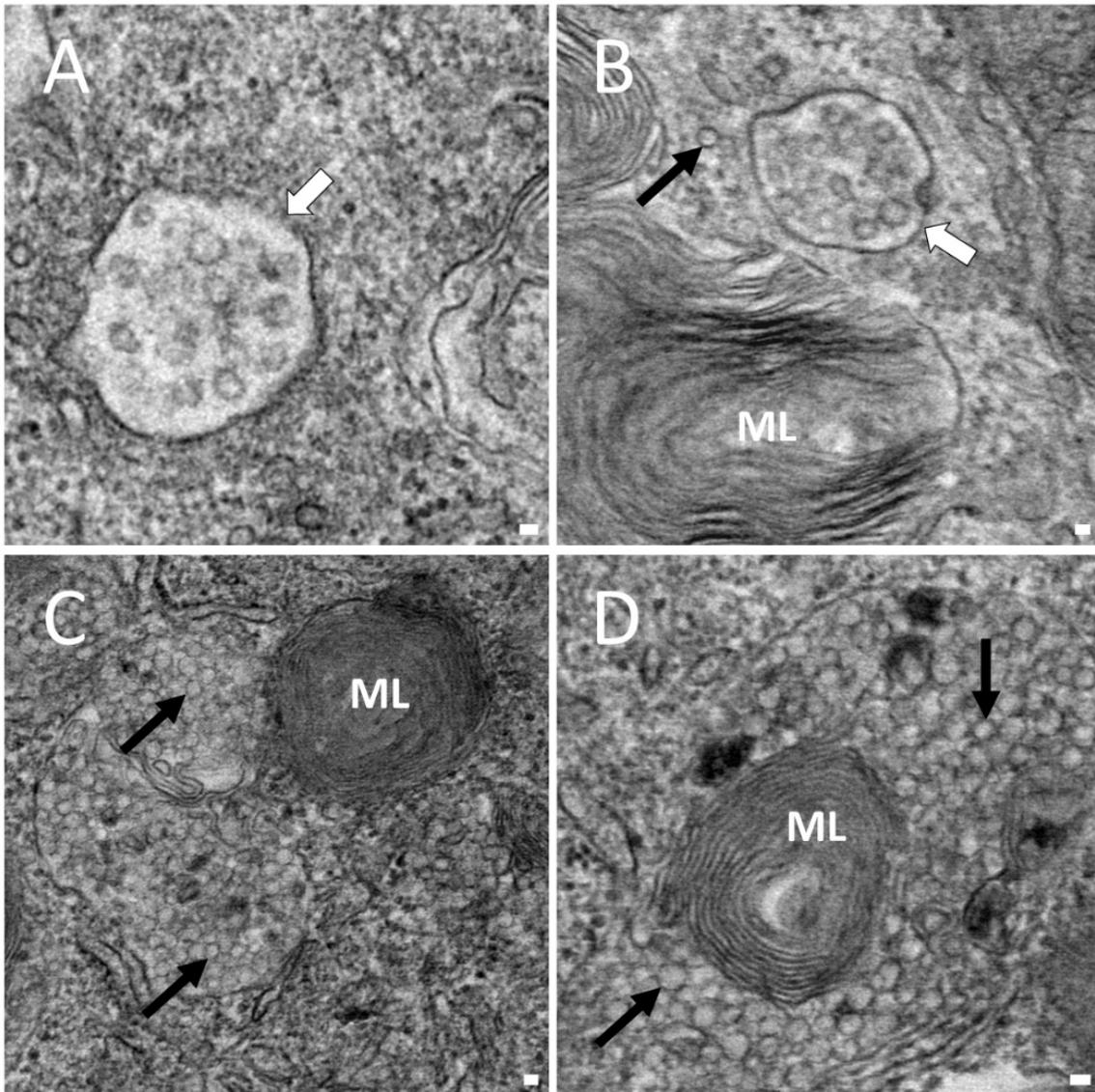


FIGURA 40. Localización intracelular de los PSNPs en las células Caco-2 (MET). Imágenes reflejando la localización de los PSNPs tras las diferentes exposiciones TBBPA-PSNPs. A y B: 10 μ M de TBBPA + 1 μ g/mL de PSNPs; C y D: 10 μ M de TBBPA + 50 μ g/mL de PSNPs. ML: cuerpo multilamelar. Flechas negras: PSNPs. Flechas blancas: cuerpo multivesicular. Barra de escala: 0,04 μ m.



DISCUSIÓN



La contaminación ambiental implica que existan en nuestro entorno múltiples agentes químicos o biológicos, que acaban repercutiendo tanto en animales y plantas, como en la propia salud humana. En los últimos años se ha desarrollado el concepto de lo que se denomina como “exosoma” (Wild, 2005). Éste puede definirse como la medida de todas las exposiciones a las que se ha visto sometido un individuo a lo largo de su vida, y cómo esas exposiciones están relacionadas con su salud. Dichas exposiciones comienzan desde antes del nacimiento e incluyen todas las agresiones de origen tanto medioambiental (medio ambiente, dieta, estilo de vida...) como ocupacional. Entender cómo interactúan con las características inherentes del individuo, tales como la genética, la fisiología y la epigenética, permite determinar su impacto sobre la salud (NIOSH, 2023).

El exosoma humano puede ser caracterizado estudiando los constituyentes corporales más importantes que se generan tanto frente a compuestos endógenos como exógenos. Esta aproximación de “arriba-abajo” emplea las tecnologías ómicas sobre los tejidos y fluidos biológicos para poder caracterizarlo. De esta forma, todos los compuestos químicos relevantes pueden ser medidos, incluyendo aquellos generados de forma endógena, a partir de procesos biológicos tales como los inflamatorios y el estrés oxidativo. Desde un punto de vista toxicológico, son los compuestos químicos presentes en los fluidos biológicos, como el plasma, los que entran en contacto con los tejidos y células del cuerpo y generan condiciones patológicas sobre la salud. De este modo, el exosoma interno representa la dosis total de estos compuestos químicos en el cuerpo, sin importar su origen o de qué otro compuesto deriva (Smith, 2014).

Para determinar correctamente los efectos tóxicos que pueden ejercer los compuestos químicos o sus mezclas, es imprescindible conocer previamente el efecto que tienen dichos compuestos por separado sobre los diferentes modelos de estudio escogidos para su evaluación. Es de suma importancia realizar un diseño experimental adecuado, desarrollando una estrategia a partir de la cual se seleccionen las condiciones y parámetros que permitan determinar el potencial toxicológico, evaluar la dosis-respuesta de estos compuestos y, finalmente, obtener la información más relevante que permita dilucidar el potencial tipo de interacción existente entre ellos. Un buen diseño experimental permite obtener resultados fiables y robustos, e incluso tendrá en cuenta sus propias limitaciones a la hora de analizar los datos obtenidos (Michaud *et al.*, 1995). Esto permitirá un análisis directo (Casella, 2008) y, de esta forma, discernir la existencia de interacciones y otras determinaciones con relativa facilidad.

Dentro de las múltiples metodologías existentes para la evaluación de los efectos de los compuestos químicos sobre la salud ambiental y humana, los métodos *in vitro* evitan el uso de animales de experimentación y reflejan nuestra actual comprensión mecanicista de los mismos. El uso de modelos celulares es uno de los más desarrollados y utilizados, ya que permite evaluar los efectos que tienen los compuestos sobre la fisiología celular (Mukherjee, 2019).

Frente a condiciones de estrés, las células responden de formas variadas, desde la activación de rutas que promueven la supervivencia hasta desencadenando determinados mecanismos de muerte celular programada que eliminan las células dañadas. La respuesta inicial de las células frente a estímulos de estrés tiene como objetivo la defensa de la célula frente a ellos y recuperarla de las agresiones sufridas, activando una serie de respuestas al estrés celular (RSCs) características. Sin embargo, si no es capaz de resolver adecuadamente el estímulo dañino, entonces las células activan una serie de mecanismos que conducen a la muerte celular (Fulda *et al.*, 2010).

Estas RSC engloban una serie de funciones celulares definidas, entre las que se encuentran el control del ciclo celular, la eliminación de proteínas dañadas y la regulación de determinados aspectos del metabolismo (Kültz,

2003). Ello implica que se produzcan una serie de respuestas temporales frente a las diferentes agresiones que pueden generar daños específicos en determinadas localizaciones celulares (Kültz, 2005). Por lo tanto, las RSC pueden llegar a ser muy variadas y mientras mantengan una respuesta apropiada frente a dichos estímulos, las células tendrán asegurada su supervivencia. Si, por ejemplo, el agente estresante es demasiado fuerte, se terminarán activando determinadas cascadas de señalización que finalizarán con la muerte celular. La capacidad adaptativa de la célula es lo que determina en última instancia su destino (Fulda *et al.*, 2010).

Las principales respuestas pro-supervivencia de la célula, recogidas en Fulda *et al.*, 2010, son:

- Respuestas frente al shock térmico: responden frente a multitud de estímulos, tales como estrés oxidativo y frente a metales pesados, así como frente a temperaturas moderadamente elevadas. Estas respuestas fueron observadas y descritas por primera vez al evaluarse dicho fenómeno, del que deriva su nombre. Una de las principales consecuencias de esta clase de agresiones es el daño a proteínas, lo que lleva a la acumulación de proteínas mal plegadas. Para contrarrestar esto, la célula incrementa la producción de chaperonas (como p. ej. Hsp70), las cuales repliegan las proteínas mal plegadas de forma correcta y alivian la acumulación de éstas en la célula. Esto hace que las células se vuelvan algo más resistentes frente a las agresiones tóxicas de forma transitoria, sin embargo, si la agresión es demasiado elevada, la célula no activará estas respuestas y procederá a activar mecanismos de muerte celular.
- Respuestas frente a proteínas mal plegadas (UPR): también conocidas como respuestas frente al estrés del retículo endoplasmático (RE). El RE es clave en el procesamiento postranscripcional de las proteínas secretoras y de membrana, incluyendo procesos como glicosilación, formación de puentes disulfuro, plegamiento y oligomerización de proteínas. Frente a determinadas condiciones de estrés, como la privación de glucosa, hipoxia, inhibición de la glicosilación de proteínas y perturbaciones en la homeostasis del Ca^{2+} , se da una acumulación de proteínas mal plegadas en el RE (estrés del RE). Ésta resulta en la activación de múltiples rutas en un fenómeno conocido como respuesta frente a proteínas mal plegadas (UPR), activando tanto una serie de proteínas residentes en el RE como ciertos factores de transcripción. Éstos a su vez favorecen la transcripción de chaperonas moleculares en el RE, así como complejos de degradación de proteínas asociados al RE (ERAD) y la activación de genes antioxidantes. Esta señalización generalmente promueve la supervivencia celular mejorando el equilibrio entre la carga proteica y la capacidad del RE para plegar las proteínas dañadas.
- Respuestas frente al daño al ADN: frente al estrés celular ocasionado por la exposición a agentes quimioterapéuticos, irradiación o agentes medioambientales genotóxicos como los hidrocarburos policíclicos o la radiación ultravioleta (UV), el daño al ADN es un evento inicializador común, originándose roturas tanto en una (SSBs) como en las dos hebras (DSBs). Ambas lesiones son generalmente reparadas por la célula, empleando diferentes mecanismos en función del daño ocasionado en la propia molécula del ADN, asegurando la supervivencia celular en caso de agresiones subletales. Algunos ejemplos consisten en la reparación por escisión de nucleótidos (NER), reparación por escisión de bases (BER), recombinación homóloga, unión de extremos no homólogos (NHEJ) y reparación de errores de emparejamiento (MMR). Si el daño ocasionado resulta ser demasiado grave como para ser reparado, se activarán una serie de moléculas inducibles frente al estrés que propagarán y modularán la señal que conducirá a la muerte celular, tales como NF- κ B, p53, JNK o MAPK/ERK.

- Respuestas frente al estrés oxidativo: la supervivencia celular requiere de una correcta proporción de oxígeno molecular y de varios agentes antioxidantes. Los productos reactivos de oxígeno se encuentran entre las más potentes y omnipresentes amenazas a las que se enfrentan las células. Estos productos incluyen el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete, radical hidroxilo (OH), radical peroxilo y óxido nítrico (NO). En las células normalmente existe un equilibrio entre las especies pro-oxidativas y determinados mecanismos de defensa antioxidantes. El estrés oxidativo se da cuando hay una alteración en este delicado equilibrio, el cual está implicado en numerosos procesos biológicos y patológicos, ya que pueden provocar daños en toda clase de macromoléculas, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos. Si la célula ve sobrepasada su capacidad para sobreponerse a las agresiones que perturban este equilibrio puede llegar a morir, tanto mediante apoptosis como por necrosis.

Hay varias evidencias del solapamiento entre las vías de señalización frente al estrés oxidativo y otras rutas de respuesta frente al estrés. Por ejemplo, el estrés oxidativo provoca un aumento de la expresión de ciertas chaperonas. Por otra parte, la activación de la UPR estimula la regulación positiva de genes antioxidantes, como el factor de transcripción Nrf2, el cual regula a su vez ciertos genes relacionados con la transcripción de enzimas involucradas con la biosíntesis del glutatión (GSH). Además, las perturbaciones en el potencial redox celular predisponen a las células a los efectos dañinos del estrés del RE. Por lo tanto, cuando las defensas naturales antioxidantes de la célula se ven sobrepasadas, estas especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden inducir la muerte celular.

En resumen, el estrés celular puede llegar a dañar diversas macromoléculas, siendo éstas fundamentalmente proteínas, lípidos de membrana y/o ADN (Kültz, 2003). Por todo ello, se puede decir que los sensores de daño en membrana, proteínas y ADN, así como los redox, son reguladores clave en las rutas de señalización de estas RSC (Kültz, 2005).

Al analizar estas RSC mediante la aproximación de las Adverse Outcome Pathways (AOPs), podemos obtener información pragmática que permita desarrollar una estrategia adecuada empleando métodos alternativos. Esto se debe a que se usa la información disponible relacionada con una respuesta toxicológica, describiendo las relaciones causales o mecanicistas entre un evento molecular iniciador (EMI), una serie de eventos clave intermedios y un resultado adverso (Halappanavar *et al.*, 2020).

Estas RSC están conservadas filogenéticamente y presentes en las células de todos los organismos, activándose a dosis bajas del estímulo que ocasiona el estrés en la célula (Kültz, 2005). Además, todas las RSC poseen una estructura común, en la cual se produce la activación de un factor de transcripción que regula la expresión génica, uniéndose a regiones de unión al ADN denominadas “elementos de respuesta”; una proteína sensor que activa o inactiva al factor de transcripción y una proteína transductora que actúa a un nivel por encima del complejo sensor/factor de transcripción. Por todo ello, son capaces de brindar información relevante antes de que se desarrolle un daño celular significativo.

En consonancia con estas premisas, esta tesis doctoral se enfoca en la evaluación de los efectos ejercidos por dos de los contaminantes emergentes que más preocupación están suscitando actualmente a nivel global de manera individual y en combinación. Se seleccionaron el TBBPA, el retardante de llama de mayor producción y consumo (Alaee *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2020) y los PSNPs, partículas de plástico de pequeño tamaño y cuyas propiedades favorecen la adsorción de varios contaminantes sobre su superficie (Sharma & Chatterjee, 2017; Tallec *et al.*, 2019).

Este enfoque se realizó sobre modelos celulares pertenecientes a diferentes organismos, para tratar de evaluar la influencia de las combinaciones y determinar si se da o no una respuesta en común frente a los compuestos. Los modelos empleados en esta tesis se basan en líneas celulares de un organismo acuático (*Oncorhynchus mykiss*) y de mamíferos, concretamente de origen humano. A nivel de fisiología celular, ambos modelos se comportan de forma similar al evaluar las respuestas citotóxicas ejercidas por diferentes compuestos químicos en las determinaciones de toxicidad aguda (Castaño & Gómez-Lechón, 2005), lo que permite la comparación de los efectos ejercidos por los compuestos entre ambas aproximaciones.

De esta manera podemos estudiar los efectos producidos por ambos compuestos químicos y evaluar la viabilidad celular mediante una batería de ensayos multiparamétricos que nos permita determinar la integridad celular de forma general. Mediante esta primera aproximación, se realiza la evaluación de una serie de parámetros complementarios entre sí para la determinación de la citotoxicidad basal, que nos brindan información sobre el estado celular al evaluar aquellas dianas susceptibles de sufrir alteraciones: la actividad metabólica y la integridad de las membranas celulares (Mukherjee, 2019).

Esto nos permitirá escoger las condiciones más adecuadas para la realización de los posteriores ensayos, los cuales tendrán como objetivo el evaluar los efectos ejercidos por los compuestos de una forma más específica y localizada. De esta forma, lo que se pretende es seleccionar aquellas condiciones que, o bien, poseen un potencial citotóxico bajo, o bien se trata de concentraciones subcitotóxicas, evaluando las rutas que se activan en condiciones de estrés celular mediante el análisis de bioindicadores que nos permitan monitorizar los cambios producidos en el microambiente celular.

La presencia de los PSNPs en las mezclas influye ligeramente en la toxicidad del TBBPA

El primero de los compuestos evaluados fue el TBBPA, estudiando sus efectos sobre tres líneas celulares diferentes pertenecientes a la trucha arcoíris, así como sobre dos líneas celulares intestinales humanas y su co-cultivo, lo que permite determinar la sensibilidad al compuesto de una forma precisa.

En primer lugar, se estudiaron los efectos sobre las líneas RTgill-W1 (branquias), RTL-W1 (hígado) y RTgutGC (intestino), que representan tres de las dianas más relevantes en peces en relación con la exposición a diferentes agentes contaminantes en el medioambiente. Esta aproximación se realizó mediante un protocolo de citotoxicidad basal, para definir y ajustar el rango de tratamientos a partir del cual se realizarán los subsiguientes ensayos, puesto que permite la caracterización del perfil toxicológico de los compuestos evaluados (Ekwall, 1995). A pesar de que el amplio rango de concentraciones evaluado (1 – 150 μM) se encuentra por encima de las detectadas en el medio ambiente (de Wit, 2002; Covaci *et al.*, 2009), nos permite seleccionar las concentraciones más relevantes para la realización de los subsiguientes ensayos y, más importante aún, escoger aquellas que demuestren ser las más adecuadas para la evaluación de las mezclas con los PSNPs. No obstante, las bajas concentraciones detectadas en el medio ambiente pueden deberse a que se encuentra generalmente unido covalentemente a la estructura de los polímeros que recubre (Alaee *et al.*, 2003).

La citotoxicidad basal del TBBPA tras la exposición a 24 h sobre las líneas celulares de peces reveló una tendencia similar en las tres, apreciándose una reducción notable de la viabilidad celular entre las concentraciones de 25 y 50 μM de TBBPA. Tanto la evaluación de la actividad metabólica (AB), como la de la integridad de la membrana plasmática (CFDA-AM) muestran un comportamiento similar, indicando un daño

celular generalizado a partir de la concentración de 50 μM de TBBPA. Sin embargo, se puede apreciar que en la línea RTgill-W1 se observan efectos a partir de 25 μM al evaluar el AB, sugiriendo ser más sensible al TBBPA. Los datos obtenidos para las EC_{50} y BMDs corroboran la mayor sensibilidad de la línea RTgill-W1 con respecto a las otras dos.

La elevada sensibilidad de las células RTgill-W1 para la realización de estudios de citotoxicidad basal está bien documentada (Lee *et al.*, 2009; Tanneberger *et al.*, 2013; Yue *et al.*, 2015), y justifica que esta línea se haya incorporado a la normativa ISO 21115:2019 como referencia para estudios de toxicidad aguda en muestras de agua, así como en la prueba nº 249 de la OECD (OECD, 2021).

Por otro lado, la menor sensibilidad de las líneas celulares hepática (RTL-W1) e intestinal (RTgutGC) puede deberse a los mecanismos de detoxificación presentes en peces para el TBBPA (Shen *et al.*, 2012; Nos *et al.*, 2020), puesto que ambas líneas exhiben una mayor actividad enzimática del citocromo P-450 que las RTgill-W1 (Stadnicka-Michalak *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos se correlacionan bien con los de otros estudios de citotoxicidad del TBBPA en diferentes líneas celulares, como en líneas intestinales humanas (Huang *et al.*, 2021) y líneas celulares de riñón de rata (Strack *et al.*, 2007). Sin embargo, difieren del único estudio con TBBPA realizado en líneas celulares de peces (concretamente en una línea celular hepática de pez cebra), el cual muestra unos valores de EC_{50} más bajos (Yang & Chan, 2015) que los obtenidos en este caso. Este hecho puede deberse a la ausencia de suero en el medio de cultivo empleado en dicho estudio, ya que la presencia de éste es capaz de afectar a la toxicidad ejercida por compuestos tales como nanoplásticos (Clift *et al.*, 2010), o metales (Borenfreund & Puerner, 1986) siendo mayor la toxicidad cuanto menor sea la concentración de suero en el medio empleado.

Al igual que se hizo para las diferentes líneas celulares de peces, se evaluó la citotoxicidad basal del TBBPA en las líneas celulares intestinales humanas, Caco-2 y HT29-MTX, así como su co-cultivo. Con fines comparativos, se empleó el mismo rango de concentraciones (1 – 150 μM) que el evaluado en las líneas celulares de peces. Estas concentraciones son muy superiores a los niveles detectados en muestras humanas de plasma (Hays & Kirkman, 2019), relacionado con que el TBBPA en humanos y ratas es rápidamente conjugado en el hígado y consecuentemente excretado en la bilis, lo que hace que la disponibilidad sistémica sea menor (Schauer *et al.*, 2006), así como de tener una vida media corta de aproximadamente 2 días (Jakobsson *et al.*, 2002). A pesar de ello, el TBBPA puede acumularse en humanos, especialmente cuando se dan exposiciones repetidas (Covaci *et al.*, 2009) por lo que el estudio de concentraciones más elevadas puede ser útil para discernir potenciales mecanismos de toxicidad (Zhou *et al.*, 2020), así como para la evaluación de riesgos asociados a exposiciones ocupacionales o accidentales sobre la población.

La evaluación de los efectos citotóxicos sobre la línea celular Caco-2 muestra que se ve afectada de forma general a partir de 100 μM , mientras que las HT29-MTX son más resistentes, viéndose afectada a partir de 125 μM y únicamente en la concentración más elevada del rango (150 μM) al evaluar la integridad de la membrana plasmática con la CFDA-AM. En cuanto al co-cultivo Caco-2/HT29-MTX, aunque parece ser más sensible a nivel de la actividad metabólica, ya que se dan alteraciones a partir de 50 μM , se comporta igual que las HT29-MTX al evaluar la integridad de la membrana plasmática, mientras que la integridad lisosomal no se ve afectada en absoluto. Por ello, podemos decir que el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX presenta una sensibilidad al compuesto característica que difiere de la observada en las dos líneas celulares por separado, resistiendo mejor de forma general los efectos citotóxicos del TBBPA.

El hecho de que la línea Caco-2 sea la más perjudicada a rasgos generales, se explica por su estado indiferenciado, y a que no expresarán rasgos propios de células diferenciadas hasta que alcancen un fenotipo

enterocítico tras su mantenimiento en un estado de confluencia sostenido durante aproximadamente 3 semanas. Entre dichas características se incluyen proteínas típicas del citoesqueleto como, por ejemplo, la villina, así como las propias de las uniones estrechas (Fedi *et al.*, 2021). Además, estas células tanto en su estado indiferenciado como diferenciado, poseen una actividad del citocromo P450 baja o nula (Ozawa *et al.*, 2015; Küblbeck *et al.*, 2016), lo que confirma que se vean más perjudicadas por los efectos del TBBPA que el resto de las líneas intestinales.

Las HT29-MTX, se encuentran especializadas en la secreción de mucus, con un fenotipo similar al de las células caliciformes maduras (Lesuffleur *et al.*, 1990), lo que justifica su resistencia superior al TBBPA. Este mucus juega un papel destacado en la captura de compuestos químicos y puede tanto disminuir su toxicidad como potenciar los efectos tóxicos de dichos compuestos (Gillois *et al.*, 2018). En el caso del TBBPA parece tener un papel protector, disminuyendo los efectos tóxicos que genera el compuesto sobre las células. Sólo en altas concentraciones el TBBPA ejerce un efecto perjudicial, mientras que mantiene relativamente estable la integridad celular al evaluar el resto de concentraciones en comparación con las Caco-2.

Curiosamente, la evaluación de los efectos del TBBPA sobre el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX mostró alteraciones en la actividad metabólica a partir de la concentración de 50 μ M, hecho que no se observa en la evaluación de las dos líneas por separado. Este resultado puede deberse de alguna forma al mucus producido por las HT29-MTX, ya que como se ha mencionado es capaz de atrapar los compuestos químicos presentes en el medio (Gillois *et al.*, 2018), y quizá exponga a las células Caco-2 de una forma más directa al compuesto, generando un daño mayor. Por otro lado, se ha visto que las HT29-MTX ejercen ciertos efectos moduladores sobre la diferenciación y crecimiento de las Caco-2, incluso a baja densidad celular, sugiriendo cambios tanto sobre la morfología de estas células como sobre su actividad metabólica al mantenerse ambas en co-cultivo (Berger *et al.*, 2017). Anteriormente se pudo comprobar que, de las tres aproximaciones empleadas para la evaluación de la citotoxicidad basal, el AB demostró ser el ensayo más sensible de los tres. Si las HT29-MTX realmente son capaces de modificar de tal forma a las Caco-2 en co-cultivo, esto podría explicar el porqué de estos resultados, haciéndolas más susceptibles a los efectos del TBBPA e indicando que realmente el co-cultivo presenta unas características propias que lo diferencian de las líneas celulares por separado. La CFDA-AM mostró que el co-cultivo se comporta de igual manera que las HT29-MTX por separado, mientras que en relación con la integridad lisosomal (RN) el co-cultivo vuelve a diferenciarse de ambas líneas, no detectándose alteraciones en ninguna de las concentraciones evaluadas. Los valores de relevancia toxicológica (BMDs) confirman estos efectos y, además, nos indican que el co-cultivo es más resistente a los efectos citotóxicos del TBBPA que las líneas por separado, incluso a nivel de la actividad metabólica la cual es similar a la presentada por las HT29-MTX, a pesar de su aparente susceptibilidad.

Los resultados obtenidos al realizar la evaluación tanto en las líneas celulares de peces como en las líneas intestinales humanas se correlacionan bien entre ellos, exhibiendo un comportamiento similar al compararlas entre sí. Las diferencias observadas a nivel de sensibilidad se deben fundamentalmente a la cantidad de suero presente al realizar las diferentes evaluaciones, explicando el porqué de la mayor citotoxicidad ejercida por el TBBPA en las primeras, tal y como se ha comentado anteriormente, debido a la influencia del suero en el medio de cultivo (Borenfreund & Puerner, 1986).

En vista de los resultados obtenidos, se consideró continuar el resto de aproximaciones experimentales empleando las líneas RTgill-W1, Caco-2 y el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX. Las RTgill-W1, por ser el modelo más sensible en las determinaciones realizadas con las diferentes líneas de peces; las Caco-2 por tratarse del modelo más sensible en los modelos celulares intestinales y, por último, el modelo del co-cultivo, tanto por sus características diferenciales, como por emular las condiciones fisiológicas.

A continuación, se procedió a evaluar el potencial citotóxico de los PSNPs en las líneas celulares escogidas. En el caso de las RTgill-W1, el rango de estudio empleado (1 – 200 µg/mL), excede ampliamente los valores promedio observados en las masas de agua de EE. UU. y Europa, así como en la tundra siberiana (Koelmans *et al.*, 2015; Materic *et al.*, 2022). Aun así, este rango nos permite estudiar las diferentes concentraciones y determinar los efectos citotóxicos de estos PSNPs, posibilitando la selección de las concentraciones más adecuadas para realizar las diferentes combinaciones con TBBPA posteriormente. Por otro lado, la determinación de los valores de concentración presentes en los medios acuáticos debe tomarse con cautela, debido a la dificultad que presenta la correcta evaluación de su presencia en dichos medios (Koelmans *et al.*, 2015). Además, debe considerarse el hecho de que estas nanopartículas poseen la capacidad de bioacumularse y bioamplificarse al ser ingeridas por los organismos acuáticos (Nelms *et al.*, 2018; Zaki & Aris, 2022), por lo que el estudio de un rango amplio puede proporcionar información relevante en cuanto a sus potenciales efectos citotóxicos.

La caracterización de estos PSNPs mostró una capacidad de agregación variable, sin embargo, éstos acaban por estabilizarse tras su incubación durante 24 h en los diferentes medios de cultivo. El hecho de que las proteínas presentes en el suero puedan estabilizar estas nanopartículas y, por lo tanto, evitar la formación de agregados mediante la formación de una biocorona, ya ha sido reportado tanto en el caso de estos PSNPs (Almeida *et al.*, 2019), como para otras nanopartículas (Lammel & Sturve, 2018). El valor del potencial Z obtenido confirma las propiedades de estas PSNPs, las cuales se encuentran carboxiladas, además de exhibir un comportamiento equiparable al previamente determinado en otros medios de cultivo (Hesler *et al.*, 2019).

Los ensayos de citotoxicidad basal muestran que los PSNPs presentan efectos citotóxicos a partir de 25 µg/mL al evaluar la actividad metabólica (AB), mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto a las células sin tratar. Sólo en las concentraciones más elevadas parece haber una disminución de la viabilidad celular notablemente significativa, mostrando la sensibilidad de la línea RTgill-W1 a estos PSNPs en altas concentraciones. En el caso de la integridad de la membrana plasmática (CFDA-AM), no se observan efectos significativos en ninguna de las concentraciones estudiadas, lo que indica que no parecen afectar a la integridad celular en nuestras condiciones experimentales. Estos resultados son similares a los previamente descritos en otras líneas de peces, así como en las propias RTgill-W1 (Almeida *et al.*, 2019; Jimeno-Romero *et al.*, 2021).

El hecho de que esta línea celular sea más sensible al ser evaluada mediante el AB, nos da una idea de su posible potencial citotóxico, ya que se ha visto que pueden llegar a acumularse en órganos internos, así como en branquias, intestino y piel de la fauna acuática en función de su tamaño (Torres-Ruiz *et al.*, 2021). Sin embargo, en vista de lo mencionado anteriormente, así como teniendo en cuenta la influencia del suero sobre la toxicidad ejercida por los nanoplásticos (Clift *et al.*, 2010), podemos asumir que estos PSNPs poseen generalmente un potencial toxicológico bajo. Las BMDs calculadas para estos PSNPs confirman una mayor sensibilidad a nivel de la actividad metabólica, aunque debe destacarse que el rango obtenido es bastante amplio. Estos datos corroboran que el potencial toxicológico de los PSNPs es relativamente bajo y sólo parecen ejercer efectos significativos a nivel de la actividad metabólica.

Por otro lado, se evaluó la influencia de los PSNPs sobre las Caco-2 y el co-cultivo para determinar los efectos de estas nanopartículas sobre dichas líneas. En este caso se evaluó el rango comprendido entre 1 – 50 µg/mL ya que, aunque sigue abarcando concentraciones que superan las dosis determinadas en el medio ambiente (Koelmans *et al.*, 2015; Materic *et al.*, 2022), son lo suficientemente elevadas como para determinar los

potenciales efectos de su exposición ocupacional, así como el debido a exposiciones repetidas. Esto se da, por ejemplo, en situaciones como la ingesta oral gracias a su capacidad de acumulación, que es bastante elevada en células Caco-2 (Domenech *et al.*, 2021a), especialmente en nanopartículas de pequeño tamaño (< 100 nm) (Forte *et al.*, 2016).

La evaluación de estos PSNPs sobre las Caco-2 muestra una ligera sensibilidad frente a ellos a nivel de integridad de la membrana plasmática, siendo estadísticamente significativa en todas las concentraciones analizadas, mientras que en el caso del co-cultivo es sobre la actividad metabólica donde se aprecian unas muy ligeras diferencias significativas con respecto a las células sin tratar. Estas diferencias vuelven a dejar patente el diferente comportamiento de las células en co-cultivo, e igual a lo que ocurría con el TBBPA, las células Caco-2 puedan volverse más susceptibles debido a la influencia de las HT29-MTX (Berger *et al.*, 2017), si bien en contraste son más resistentes a nivel de integridad de la membrana plasmática.

El hecho de que estos PSNPs presenten unos efectos citotóxicos tan sutiles se debe probablemente a la carga negativa que poseen, ya que se ha visto que la biocorona que recubre a los PSNPs cargados positivamente es degradada al ser procesados en los lisosomas, quedando dicha carga expuesta, provocando daños en estos orgánulos y liberándose su contenido al citoplasma celular lo que provoca su apoptosis en última instancia (Wang *et al.*, 2013). Además, estos resultados concuerdan con lo observado previamente en otros tipos de células intestinales, tanto diferenciadas (Hesler *et al.*, 2019; Domenech *et al.*, 2021a) como indiferenciadas (Wu *et al.*, 2019; Cortés *et al.*, 2019), al emplear esta clase de nanoplasticos. Debido a que estos PSNPs no ejercen ningún tipo de toxicidad relevante, no fue posible calcular ni los EC₅₀ ni las BMDs.

Por lo tanto, estos PSNPs exhiben un comportamiento similar al evaluarlos tanto en las RTgill-W1 como en las líneas intestinales, corroborando el hecho de que, además de ser ambas aproximaciones complementarias entre sí, los PSNPs carboxilados empleados en estas determinaciones no ejercen efectos citotóxicos notables y, por lo tanto, poseen un potencial toxicológico muy bajo.

Las combinaciones TBBPA-PSNPs modifican las rutas de estrés celular

Tras determinar los efectos que producían tanto el TBBPA como los PSNPs de forma individual, se procedió a evaluar sus potenciales daños en combinación en las líneas celulares seleccionadas. Puesto que no fue posible calcular los EC₅₀ de los PSNPs, y los rangos calculados con las BMDs en las células RTgill-W1 son bastante amplios, se escogieron las concentraciones de 1, 10 y 50 µg/mL. Las dos primeras muestran efectos citotóxicos leves sobre las células intestinales evaluadas anteriormente, apreciándose daños a nivel de integridad de la membrana plasmática en las Caco-2 y a nivel metabólico en el caso del co-cultivo. Por otro lado, la concentración de 1 µg/mL corresponde a la más baja evaluada en los tres tipos celulares y 50 µg/mL con la máxima concentración evaluada en las líneas celulares intestinales humanas, y muestra efectos citotóxicos tanto en éstas como en las RTgill-W1.

En relación con el TBBPA, para la evaluación con las RTgill-W1 se seleccionaron aquellas condiciones que demostraron ser subcitotóxicas o ligeramente tóxicas al analizar los valores de EC₅₀ obtenidos previamente, siendo éstas 5, 10 y 25 µM. En cuanto a las Caco-2 y el co-cultivo, dado que no se pudieron calcular los EC₅₀, se escogieron las concentraciones de TBBPA de 10, 50 y 100 µM. La primera coincide con la escogida para las RTgill-W1, que presenta efectos subcitotóxicos, la segunda es aproximadamente la concentración en la que comienzan a observarse efectos sobre la actividad metabólica con el ensayo AB, según lo calculado con las

BMDs en las líneas celulares Caco-2 y HT29-MTX, así como en el co-cultivo. Por último, se seleccionó la concentración de 100 μM , en la que se aprecian efectos citotóxicos de forma general en la línea Caco-2. En el caso del TBBPA, se han observado efectos citotóxicos en células de mamífero, en evaluaciones en las que se emplean concentraciones similares (Wu *et al.*, 2018) a las seleccionadas en nuestro caso.

Las concentraciones de PSNPs escogidas, citadas previamente, ya han sido evaluadas en otros estudios y todas ellas muestran efectos citotóxicos leves tanto en células de mamífero (Hesler *et al.*, 2019; He *et al.*, 2020) como en las de peces (Almeida *et al.*, 2019; Jimeno-Romero *et al.*, 2021), mientras que 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lo hace además en evaluaciones en las que se han empleado células intestinales (Domenech *et al.*, 2020).

En la evaluación realizada con las RTgill-W1, la exposición combinada de las condiciones de TBBPA seleccionadas mostró diferencias significativas únicamente en la combinación 10 μM de TBBPA + 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSNPs, tanto al evaluar la actividad metabólica como la integridad de la membrana plasmática. Esta circunstancia parece indicar un ligero efecto potenciador a pesar de que la influencia de los PSNPs es desigual en las diferentes combinaciones y no sigue un patrón definido. Al analizar las BMDs, podemos determinar que el efecto de los PSNPs en las mezclas TBBPA-PSNPs es muy leve, debiéndose los efectos citotóxicos observados fundamentalmente al TBBPA. Por tanto, los PSNPs ejercen únicamente una muy ligera potenciación en una de las tres combinaciones analizadas.

La exposición de las diferentes combinaciones en la línea Caco-2 muestra que todas las concentraciones de TBBPA combinadas con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSNPs presentan diferencias significativas al compararlas con respecto a las concentraciones de TBBPA individual en el ensayo de integridad de la membrana plasmática. Aunque no significativas, también se aprecian efectos a nivel metabólico en las combinaciones 50 μM TBBPA + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSNPs y 100 μM TBBPA + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSNPs. Sobre la integridad lisosomal, no se aprecian efectos en ninguna de las combinaciones analizadas. En el caso del co-cultivo, a excepción de las combinaciones con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las mezclas con PSNPs (10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) presentaron diferencias significativas con respecto a la condición individual de TBBPA (10, 50 y 100 μM) al evaluar la integridad plasmática. Sin embargo, la combinación de 10 μM TBBPA + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSNPs resultó ser la única que mostró diferencias significativas con respecto a 10 μM TBBPA en la evaluación de la actividad metabólica. Igual que en el caso de las células Caco-2, a nivel lisosomal no se aprecian diferencias significativas en ninguna de las combinaciones estudiadas. El análisis de las BMDs permite determinar que, igual que ocurría con las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs en las RTgill-W1, el efecto de los PSNPs en las mezclas TBBPA-PSNPs es muy leve o directamente no ejercen ningún efecto, especialmente en las Caco-2. En estas células sólo se aprecia a nivel de integridad de la membrana plasmática un ligero efecto de potenciación, tal y como se observa en la evaluación de la citotoxicidad de dichas mezclas, las cuales sólo muestran diferencias estadísticamente significativas frente a la condición de TBBPA individual en la CFDA-AM. En contraste, en el co-cultivo se pueden apreciar efectos potenciadores ligeros tanto a nivel metabólico como sobre la integridad lisosomal, pero un efecto algo más notable sobre la integridad de la membrana plasmática. Esto es así debido a que la citotoxicidad de las mezclas en el co-cultivo reveló más combinaciones que presentaban diferencias estadísticamente significativas que en el caso de las células Caco-2, tanto en el AB como en la CFDA-AM. Al comparar las CEDs del TBBPA de las Caco-2 con las del co-cultivo, se aprecia que las primeras se ven más perjudicadas por los efectos tóxicos del TBBPA de forma general, mientras que el co-cultivo resiste mejor sus efectos. Por lo tanto, es el TBBPA el que determina el potencial tóxico de la mezcla, mientras que los PSNPs no modifican, o bien lo hacen de forma ligera, la toxicidad ejercida por el compuesto.

Estos resultados reflejan, además del diferente comportamiento de las células al estar en co-cultivo, que los efectos de las combinaciones no siguen un patrón y parecen ser desiguales. La adsorción del TBBPA sobre los

PSNPs probablemente dependa de las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, como se ha descrito previamente en diferentes tipos de microplásticos (Li *et al.*, 2021). La carga negativa de los PSNPs empleados en estos ensayos juega un importante papel en la formación de la biocorona y por lo tanto en sus propiedades fisicoquímicas, interacciones y efectos (Monopoli *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2022), siendo clave en la adsorción del TBBPA sobre estas nanopartículas y pudiendo explicar el porqué de estos efectos desiguales en las diferentes combinaciones. Por otro lado, el hecho de que a nivel lisosomal no parezcan darse efectos perjudiciales en ninguna de las dos evaluaciones, puede explicarse igualmente por la carga negativa de los PSNPs, puesto que como ya se ha mencionado antes son aquellas partículas que presentan carga positiva las que acaban provocando daños en estos orgánulos, exponiendo a la célula a su contenido (Wang *et al.*, 2013). Además, el hecho de que tanto en las células RTgill-W1 como en las células intestinales, las combinaciones de TBBPA-PSNPs con 10 μM de TBBPA hayan mostrado diferencias significativas con respecto a la condición individual del compuesto, demuestra que ambas aproximaciones se complementan bien y permiten comparar los resultados obtenidos.

Existen muy pocas referencias en lo relativo a las mezclas de TBBPA, así como de otros agentes contaminantes, y especialmente junto con micro y nanoplásticos, y prácticamente no se ha llegado a alcanzar ningún consenso sobre sus efectos en mezclas. Aun así, por lo general no se dan unas modificaciones significativas al evaluarse diferentes mezclas de contaminantes junto con microperlas de plástico en las líneas celulares RTgill-W1 y RTgutGC (Bussolaro *et al.*, 2019), lo que concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Por otra parte, en las evaluaciones empleando células intestinales humanas (Caco-2), se ha visto que las combinaciones de estos nanoplásticos con nanopartículas de plata, así como con nitrato de plata, no ejercían unos efectos citotóxicos relevantes, si bien eran capaces de ejercer ligeros efectos genotóxicos y de daño por estrés oxidativo al ADN (Domenech *et al.*, 2021b). También se ha determinado que las combinaciones del TBBPA con microplásticos de polietileno (PEMPs) son capaces de ejercer efectos más perniciosos que por separado sobre las Caco-2 y, en consonancia con nuestros resultados, dichos estos efectos se debían fundamentalmente al TBBPA (Huang *et al.*, 2021). Además, la exposición crónica a nanopartículas de poliestireno modifica la absorción intestinal del hierro tanto en modelos intestinales *in vitro* como en modelos *in vivo* (Mahler *et al.*, 2012), ya que provocan la disrupción de la membrana celular y son capaces de remodelar las vellosidades intestinales. Esto podría sugerir que los PSNPs facilitan la entrada del TBBPA al interior celular, actuando a nivel de la integridad de la membrana plasmática.

Una vez estudiadas las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs, se seleccionaron las que resultaron ser más prometedoras en función de lo observado en los ensayos de citotoxicidad. De esta forma, se procedió a evaluar los efectos de las combinaciones utilizando para ello diferentes aproximaciones experimentales que permitían estudiar de forma precisa y efectiva la influencia de los compuestos sobre los procesos metabólicos naturales de las células.

Las células responden de formas variadas frente a condiciones de estrés, activando rutas que permitan a la célula sobrevivir frente a las agresiones sufridas. Cuando el daño es demasiado elevado para que la célula pueda resolverlo adecuadamente, acaba por activar los mecanismos necesarios que conducen a la muerte celular (Fulda *et al.*, 2010). La generación de estrés oxidativo y las alteraciones en el potencial redox celular debidas a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), son unos de los desencadenantes más importantes de las respuestas frente al estrés celular (RSCs). La mitocondria es considerada la principal fuente de ROS en las células, y pueden tener un origen endógeno o ser provocados por factores exógenos, como la

radiación ionizante y ciertos xenobióticos o agentes contaminantes. El incremento intracelular de ROS puede ocasionar que se acumulen una serie de daños, tanto en el ADN como en proteínas y lípidos, que llevan a una disfunción progresiva de las funciones celulares e incluso a la apoptosis, incrementando la probabilidad de provocar condiciones patológicas en el organismo (Suski *et al.*, 2018).

Debido a ello, decidimos evaluar los efectos que ejercen sobre la fisiología mitocondrial las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs seleccionadas previamente, examinando además los niveles de expresión de una serie de genes relacionados con el estrés oxidativo y la reparación del daño al ADN.

Se analizaron en primer lugar las combinaciones de TBBPA (10 y 25 μM) junto con la de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSNPs en las RTgill-W1, para determinar si se producía alguna alteración de la función mitocondrial relacionada con los efectos citotóxicos observados previamente en las diferentes combinaciones de TBBPA-PSNPs. Tanto la producción de ROS, medida con la sonda H_2DCFDA , como la evaluación de las perturbaciones del $\Delta\Psi$ con el TMRM, mostraron unos resultados similares. Sólo las condiciones de 25 μM de TBBPA, tanto de forma individual como en combinación con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSNPs, presentaron diferencias significativas con respecto al control tras 24 h de exposición a los compuestos, no así entre ellas. Estos resultados indican de nuevo que el TBBPA es el responsable de los daños mitocondriales, descompensando tanto el potencial de membrana mitocondrial como el equilibrio redox.

Es importante señalar que a pesar de las dificultades para determinar la producción de ROS por el TBBPA empleando la H_2DCFDA (Szychowski *et al.*, 2016), se ha demostrado que el compuesto es capaz de inducir estrés oxidativo en distintos tipos celulares de origen humano tales como células mononucleares de sangre periférica (Włuka *et al.*, 2020), o células epiteliales alveolares (Wu *et al.*, 2018). Asimismo, puede provocar alteraciones a nivel mitocondrial en células de la microglía (Bowen *et al.*, 2020) y disminuir el $\Delta\Psi$ en hepatocitos humanos (Zhang *et al.*, 2019). Por ello, los resultados que hemos obtenido con la línea RTgill-W1 en el presente estudio concuerdan con los previamente observados en otras líneas celulares. Por otra parte, a pesar de que se ha descrito que las nanopartículas son capaces de generar estrés oxidativo (He *et al.*, 2020), este hecho depende de factores tales como el tamaño, la carga, o la dosis (Banerjee & Shelver, 2021). En general, se han observado situaciones de estrés oxidativo cuando las nanopartículas presentan carga positiva, mientras que no se observan efectos significativos en aquellas con carga negativa (Bhattacharjee *et al.*, 2014). Esto explicaría nuestros resultados ya que los PSNPs analizados se encuentran carboxilados y, por tanto, poseen carga negativa.

En las líneas celulares intestinales, se realizaron las mismas aproximaciones que con las células RTgill-W1, observándose unos resultados comparables. Se empleó únicamente el modelo del co-cultivo, donde se habían detectado efectos significativos (específicamente, en la combinación 10 μM de TBBPA + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSNPs) sobre el metabolismo celular (AB). En cuanto a la H_2DCFDA , se observan diferencias significativas con respecto a las células no tratadas únicamente en las condiciones de 100 μM de TBBPA, tanto de forma individual como en combinación con los PSNPs, pero no entre ambas, indicando una vez más que es el TBBPA el que ejerce los efectos tóxicos a nivel mitocondrial. Aunque en nuestro caso no existen diferencias significativas al evaluar las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs frente a la condición individual, Zhao *et al.*, (2023) han descrito que las combinaciones TBBPA-PSNPs ejercen efectos sinérgicos al evaluar la inducción de estrés oxidativo y la toxicidad sobre el neurodesarrollo en *C. elegans*.

En la segunda aproximación, al evaluar el $\Delta\Psi$ se observa un peculiar aumento de la intensidad de fluorescencia del TMRM en todas aquellas condiciones en las que están presentes los PSNPs, lo que provoca

que se den diferencias significativas tanto con respecto al control como frente a las condiciones de TBBPA individuales.

Esta evidencia había sido descrita previamente al evaluar los mismos PSNPs mediante TMRM en células Caco-2 (Cortés *et al.*, 2019), sugiriendo que pueda deberse a la regulación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP). Por otro lado, se ha observado que el tratamiento con PSNPs modificados con amina en macrófagos murinos primarios induce una hiperpolarización de las mitocondrias en dosis bajas (Deville *et al.*, 2020). Además, la evaluación del comportamiento de estos PSNPs sobre membranas fosfolipídicas sugiere que éstos interactúan con los lípidos presentes en ella, modificando el potencial de membrana sin provocar su disrupción. Esto puede deberse o bien a que estos PSNPs inducen la formación de poros catiónicos selectivos al adherirse a la superficie de la membrana, favoreciendo el flujo de cationes hacia el espacio extracelular, o bien a la propia internalización de estos PSNPs con carga negativa. Esto provoca, por tanto, la hiperpolarización al aumentar el potencial de membrana negativo en el espacio intracelular. Este comportamiento, al alterar la homeostasis celular, es capaz de acabar desembocando en la apoptosis celular (Perini *et al.*, 2022).

Nuestros resultados indican que los PSNPs analizados provocan la hiperpolarización mitocondrial de forma dependiente de la concentración, ya que al evaluar la concentración de 10 µg/mL con las RTgill-W1 este fenómeno no se observó, y concuerda con lo descrito previamente por Cortés *et al.*, (2019). Esta hiperpolarización parece ejercer un cierto efecto protector frente al TBBPA, tal y como se puede deducir al comparar las respectivas combinaciones frente al tratamiento individual, si bien este efecto puede ser temporal y acabar provocando un daño mayor tras exposiciones prolongadas, ya que la homeostasis celular se ve alterada tal y como se ha sugerido previamente. A pesar de ello, puede observarse que en las condiciones en las que está presente la concentración de 100 µM de TBBPA se da una bajada de la intensidad de fluorescencia, por lo que igual que ocurría con las RTgill-W1, es el TBBPA el que ejerce los efectos tóxicos en la mitocondria, tanto induciendo ROS como provocando la despolarización mitocondrial.

Un incremento intracelular en los niveles de ROS puede ocasionar una alteración o daño de las funciones celulares, especialmente si los mecanismos antioxidantes se encuentran descompensados. Los principales sistemas endógenos responsables de la detoxificación de ROS son el sistema tiorredoxina (TRX), el sistema glutatión (GSH), la peroxirredoxina, la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) (Jaganjac *et al.*, 2020). La SOD, tanto la que se encuentra en la matriz mitocondrial (codificada por el gen SOD2), como la presente en el espacio intermembrana (codificada por SOD1), aunque en menor proporción, es la encargada de convertir el anión superóxido en peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual es transformado en H₂O por la CAT (Suski *et al.*, 2018). Sin embargo, este H₂O₂ puede actuar como un mediador molecular para varias vías de señalización, entre ellas la de NRF2 (factor nuclear eritroide similar al factor 2), ya que el H₂O₂ promueve la disociación de KEAP1 (Proteína 1 Asociada A ECH Tipo Kelch), represor de este factor (Di Marzo *et al.*, 2018). Una vez esto ocurre, NRF2 es capaz de translocarse al núcleo celular e inducir la expresión génica (Zhang & Hannink, 2003).

La vía del NRF2 es la primera en activarse tras la producción de ROS, induciendo la expresión de más de 250 genes, los cuales están relacionados con multitud de procesos celulares, tales como regulación redox; metabolismo de xenobióticos, carbohidratos y lípidos; homeostasis proteica y del hierro; reparación del ADN, regulación transcripcional y relacionados con la función mitocondrial (Dodson *et al.*, 2019; Jaganjac *et al.*, 2020). GSTP1 (glutatión S-transferasa pi 1) es uno de dichos genes, y pertenece a un sistema clave para la homeostasis redox, el de glutatión (GSH), encontrándose de forma ubicua en las células. Codifica una enzima

de detoxificación de fase II, la glutatión S-transferasa, que conjuga tanto componentes endógenos como exógenos a la molécula del glutatión para reducir el estrés oxidativo (Wang *et al.*, 2015).

En este contexto, decidimos evaluar sobre el co-cultivo Caco-2/MTX los niveles de expresión de los genes relacionados con los procesos de estrés oxidativo GSTP1, NRF2 y SOD2. Nuestros resultados indican que la combinación 10 μ M TBBPA + 50 μ g/mL PSNPs presenta diferencias significativas con respecto a 10 μ M de TBBPA en los dos últimos casos, y con respecto a las células sin tratar en el caso del gen NRF2. Aunque no significativo, este incremento en la expresión génica también se observa para GSTP1, indicando que esta combinación perturba la regulación de la expresión génica frente al estrés oxidativo en nuestras condiciones experimentales. Hasta la fecha, no se tiene constancia del análisis de los niveles de expresión de genes relacionados con estrés oxidativo empleando combinaciones TBBPA-PSNPs sobre células de mamífero. Sin embargo, de forma individual se ha evaluado la expresión de algunas dianas génicas que modula el gen NRF2, así como la expresión del propio gen, en hepatocitos humanos tratados con TBBPA (Zhang *et al.*, 2019), mostrando resultados similares a los nuestros. De igual forma, nuestros datos coinciden con los previamente obtenidos para los genes GSTP1 y SOD2 en células intestinales humanas tratadas con PSNPs carboxilados, en las que no se observan efectos significativos ni siquiera en altas concentraciones (Cortés *et al.*, 2019; Domenech *et al.*, 2021a).

Para completar nuestro estudio, se analizó el potencial genotóxico de las combinaciones TBBPA-PSNPs, utilizando el ensayo Cometa para evaluar el daño del material genético, y Real-Time qRT-PCR con el fin de cuantificar cambios en los niveles de expresión de los genes representativos ATM (ataxia telangiectasia mutada), ATR (proteína relacionada con ataxia telangiectasia y Rad3), PARP1 (Poli-(ADP Ribosa) Polimerasa 1) y OGG1 (8-oxoguanina ADN glicosilasa 1). Es bien conocido que los ROS son una constante amenaza para el ADN, no sólo por daño directo sino también debido a los procesos de reparación que modifican ciertas bases pudiendo provocar inestabilidad genómica y mutaciones (Poetsch, 2020). La guanina, debido a su bajo potencial de ionización, es especialmente susceptible a los ROS formándose la base modificada 8-oxo-7,8-dihidroguanina (Cadet *et al.*, 2006; Margolin *et al.*, 2006), utilizada a menudo como biomarcador de estrés oxidativo (Chiorcea-Paquim, 2022). Mediante la vía de reparación por escisión de bases (REB) la 8-oxo-7,8-dihidroguanina es escindida por la OGG1, generando un sitio apurínico (AP) en la hebra dañada. Éste se procesará mediante el corte de dicho sitio en el esqueleto del ADN, junto con una serie de pasos adicionales, que culminan en la sustitución de la base dañada por una guanina, al utilizar como molde la hebra complementaria (Markkanen, 2017).

Además de atacar directamente a las bases, los ROS también comprometen la propia estructura del ADN, produciendo tanto roturas de cadena simple (SSBs) como de doble cadena (DSBs) (Chatterjee & Walker, 2017). La ruptura de una sola hebra puede procesarse mediante BER de “*parche corto*” donde se reemplaza únicamente la base afectada o bien, de “*parche largo*”, en la que se sustituye tanto la base afectada como algunos de los nucleótidos adyacentes (Poetsch, 2020). En este último mecanismo las SSBs son detectadas de forma transitoria por la PARP1, que lleva a cabo la síntesis de una cadena de poli ADP ribosa (PAR). Dicha PAR es utilizada como una señal que, además de mantener abierta la estructura del ADN en la zona, facilita el reclutamiento de otros componentes de REB para llevar a cabo la reparación de la hebra de ADN (Satoh *et al.*, 1994; Davidovic *et al.*, 2001; Ko & Ren, 2012; Chatterjee & Walker, 2017). Adicionalmente, OGG1 se une a PARP1 directamente a través de la región N-terminal, y dicha interacción se ve incrementada en situaciones de estrés oxidativo, ya que OGG1 potencia la actividad poli ADP ribosilación de PARP1. Asimismo, la forma activada de PARP1 inhibe a OGG1, lo que indica que ambas enzimas se autorregulan entre sí (Noren Hooten *et al.*, 2011).

Además de los procesos mencionados, la proteína quinasa ATM tiene un importante papel en la respuesta al daño al ADN. Generalmente, ésta se ve activada por la presencia de DSBs a través del complejo de reparación Mre11-Rad50-Nbs (MRN), regulando cascadas de señalización que inician la respuesta. Sin embargo, ATM también actúa como un importante sensor de ROS en las células humanas ya que al oxidarse forma un dímero mediante puentes disulfuro intramoleculares, activándose de forma independiente del complejo MRN. Esta activación de ATM en respuesta al estrés oxidativo se da específicamente por H₂O₂ (Guo *et al.*, 2010). Una vez que ATM se ve activado, éste es capaz de fosforilar al supresor tumoral p53, así como a la proteína quinasa Chk2 (Guo *et al.*, 2010), lo que da lugar a una serie de procesos en la célula que pueden acabar desembocando en apoptosis si el daño excede su capacidad de reparación (Vousden & Lu, 2002; Fischer, 2017). El papel de ATM en las respuestas frente al estrés oxidativo también se ha relacionado con la reparación de las lesiones al ADN a través del mecanismo REB (Chen *et al.*, 2012).

ATR está estrechamente relacionada con ATM, puesto que suelen activarse de forma simultánea en las células que se ven expuestas a estrés genotóxico (Smith *et al.*, 2010). ATR acaba activando a la proteína quinasa Chk1 en un proceso en el que se ven involucrados múltiples sustratos (Cimprich & Cortez, 2008). Por otra parte, se ha visto que en condiciones de estrés oxidativo, concretamente en la hiperoxia, la activación de ATM resulta ser dependiente de la activación de ATR, cosa que ocurre al contrario en otros procesos que generan estrés oxidativo, como es el caso de la radiación ionizante (Kulkarni & Das, 2008), lo que corrobora que ambos se encuentran estrechamente ligados entre sí (Cimprich & Cortez, 2008).

Nuestro abordaje experimental incluyó el ensayo Cometa alcalino para evaluar la presencia de SSBs o de DSBs, así como su modificación empleando la enzima FPG para detectar la presencia de la base modificada 8-oxo-7,8-dihidroguanina, y valorar así el daño por estrés oxidativo, tanto en las RTgill-W1 como en el co-cultivo de células intestinales humanas. También se evaluaron los cambios de expresión de los genes ATM, ATR, PARP1 y OGG1, relacionados con la reparación del daño al ADN, en este último caso.

Al evaluar las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs en las células RTgill-W1 mediante el ensayo del Cometa alcalino, no se detectaron diferencias significativas con respecto al control en ninguna de las condiciones experimentales, lo que indica que no se producen ni roturas SSB ni DSB. Por el contrario, el ensayo con FPG reveló que la combinación de 25 µM TBBPA + 10 µg/mL PSNPs ejerce un muy significativo aumento del daño por estrés oxidativo al ADN, tanto frente a la condición individual de TBBPA como con respecto a las células sin tratar. Esta modificación enzimática del ensayo Cometa (Dusinska & Collins, 1996; Cordelli *et al.*, 2021; Muruzabal *et al.*, 2021) resulta especialmente útil para detectar la presencia de la base modificada 8-oxo-7,8-dihidroguanina, un buen marcador de estrés oxidativo (Poetsch, 2020; Chiorcea-Paquim, 2022). Es interesante señalar que otros autores ya habían realizado previamente ambas pruebas en la línea celular RTgill-W1 (Bussolaro *et al.*, 2019; Amaeze *et al.*, 2015), mostrando resultados dispares en cuanto al rendimiento. En nuestro caso, la modificación con FPG potenció la sensibilidad del ensayo, permitiendo detectar un efecto pro-oxidativo moderado en la combinación 25 µM TBBPA + 10 µg/mL PSNPs que no se detectó en el resto de aproximaciones experimentales.

En el caso del co-cultivo, se detectaron diferencias significativas en el ensayo del Cometa alcalino, en ambas combinaciones TBBPA-PSNPs con respecto a la condición individual de TBBPA y frente al control. El análisis mediante la FPG, no evidenció diferencias al evaluar las mezclas frente a las condiciones de TBBPA individual. Aun así, se aprecian variaciones con respecto al control al evaluar las condiciones con 100 µM de TBBPA, tanto en combinación como de forma individual. En este último caso, la condición individual de 100 µM también resulta ser significativa al compararla frente a la concentración de 10 µM de TBBPA.

Estos resultados indican que las concentraciones elevadas de TBBPA son capaces de generar ROS en las células, provocando daños oxidativos en el ADN y generando la base modificada 8-oxo-7,8-dihidroguanina. El hecho de que sólo las condiciones con 100 μM de TBBPA resultasen ser significativas con respecto al control al evaluar la generación de ROS mediante la H_2DCFDA , confirma lo observado en el ensayo del Cometa con la enzima FPG.

Por otra parte, también indican que las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs provocan roturas en la molécula de ADN. Esto se correlaciona bien con lo ya observado por Domenech *et al.* (2021b) que demostraron que diferentes combinaciones de PSNPs con nanopartículas de plata o con nitrato de plata, ejercían unos efectos ligeramente genotóxicos y de daño oxidativo en líneas intestinales humanas al evaluarlas con estos dos ensayos.

El hecho de que se observe un efecto de daño por estrés oxidativo en el ADN en el caso de las RTgill-W1, y no en el co-cultivo, puede deberse tanto a la diferente sensibilidad celular, como a la influencia del suero en el medio de cultivo, así como a la posible influencia que puedan tener los PSNPs, la cual se ha visto que ejerce efectos distintos según las concentraciones empleadas en estas mezclas. Sin embargo, ambas aproximaciones muestran que las diferentes combinaciones son capaces de atacar a la molécula de ADN, tanto por inducción de daños genotóxicos como mediante estrés oxidativo.

El daño oxidativo observado en las RTgill-W1 puede deberse al desequilibrio del potencial redox o a la disfunción mitocondrial determinada anteriormente, ejercida por el TBBPA. Sin embargo, el hecho de que sólo se detecte un aumento del daño oxidativo al ADN en una de las dos combinaciones estudiadas, indica un efecto potenciador ejercido por los PSNPs en combinación con el TBBPA que no pudo ser detectado empleando las demás aproximaciones experimentales. Esto puede sugerir que las combinaciones TBBPA-PSNPs podrían predisponer a las células de peces a los efectos nocivos causados por otros agentes mutagénicos o carcinogénicos.

En el caso del co-cultivo se observan unos efectos parecidos, ya que el TBBPA es capaz de generar daño por estrés oxidativo a la molécula de ADN, lo cual acaba provocando daños en la propia estructura de éste. Este aspecto del TBBPA ya ha sido descrito previamente (Szychowski *et al.*, 2016), sugiriendo que este compuesto puede llegar a actuar como si de un radical libre se tratase. En cuanto a los PSNPs, el hecho de que sean capaces de ejercer un cierto efecto protector podría explicar que no se hayan visto daños por estrés oxidativo en las diferentes combinaciones de TBBPA-PSNPs frente a sus respectivas condiciones de TBBPA individual con el ensayo del Cometa modificado con la FPG. Es posible que las combinaciones de TBBPA-PSNPs acaben ocasionando un daño por estrés oxidativo al ADN que pueda ser detectado mediante el ensayo con FPG al aumentar el tiempo de exposición de dichas mezclas, y que sea mayor que el ejercido por los compuestos por separado, ya que los PSNPs alteran la homeostasis celular (Perini *et al.*, 2022).

De manera complementaria, la evaluación de los genes de daño al ADN mostró que, a excepción de PARP1, la combinación de 10 μM TBBPA + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSNPs ejerce un significativo aumento de la expresión génica con respecto a la condición individual de TBBPA en todos los genes evaluados. Es especialmente destacable que en el caso de OGG1 estas diferencias también están presentes con respecto al control, lo que nos indica que, efectivamente, se están produciendo ciertos efectos de daño por estrés oxidativo que no se aprecian en ninguna otra condición. Puesto que PARP1 inhibe la actividad de OGG1 (Noren Hooten *et al.*, 2011), esto explicaría que no se aprecien diferencias en la evaluación de PARP1 mientras que sí se da un aumento de la expresión de OGG1.

El estudio de las combinaciones TBBPA-PSNPs en los diferentes modelos celulares demuestra que se comportan de forma similar y que sólo difieren en la sensibilidad celular, la cual puede deberse no sólo al tipo celular sino a las diferentes condiciones en las que se han llevado los experimentos. Estas evaluaciones muestran que, en exposiciones agudas, las combinaciones TBBPA-PSNPs son capaces de ejercer efectos tanto citotóxicos como daños provocados por estrés celular, destacando especialmente los genotóxicos y de daño oxidativo al ADN, que no son observados al evaluar ambos compuestos por separado.

La incorporación intracelular de los PSNPs modifica el comportamiento del TBBPA en los modelos experimentales de relevancia fisiológica

Una vez estudiada la influencia de los compuestos sobre modelos celulares indiferenciados tras exposiciones agudas, se procedió a evaluar los efectos citotóxicos que presentaban sobre el co-cultivo celular de Caco-2/HT29-MTX durante los 21 días del proceso de diferenciación de estas células. Para ello, inicialmente se evaluaron nuevamente los efectos citotóxicos del TBBPA y los PSNPs por separado, durante todo el proceso de diferenciación celular (21 días), en las mismas concentraciones seleccionadas previamente durante la exposición aguda: TBBPA 10, 50 y 100 μM , y PSNPs 1, 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$.

La exposición prolongada del TBBPA muestra que sólo se aprecian diferencias estadísticamente significativas en la concentración más elevada (100 μM), tanto para el AB como para la CFDA-AM. Esto contrasta con lo observado tras 24 h de exposición, ya que en dicho caso se comenzaban a apreciar diferencias a partir de la concentración de 50 μM en el AB. Por lo tanto, parece que estas células una vez diferenciadas son capaces de resistir mejor los efectos tóxicos del TBBPA, incluso aunque en la aproximación aguda parecieran mostrarse más susceptibles a sus efectos.

Este comportamiento puede deberse a la influencia de las HT29-MTX sobre la actividad metabólica y la morfología de las Caco-2 (Berger *et al.*, 2017) en co-cultivo. Estos resultados dejan claro que las células en dicho co-cultivo acaban desarrollando una mayor resistencia a los efectos del TBBPA conforme experimentan el proceso de diferenciación. Por otro lado, también debe tenerse en cuenta la capa de mucus, la cual es capaz de modificar la biodisponibilidad de diferentes compuestos y elementos químicos (Mahler *et al.*, 2009; Gillois *et al.*, 2018). Este mucus probablemente también tenga un cierto papel, aunque limitado, en la propia disponibilidad del TBBPA. Esto se debe a que la capa que se forma sobre las células no es uniforme, sino que más bien forma parches de forma localizada (Talbot *et al.*, 2018; Gillois *et al.*, 2021). Aun así, se ha visto que las células en co-cultivo son capaces de resistir mejor los efectos tóxicos de nanopartículas de plata y otros productos de plata coloidal en comparación con las Caco-2, una vez diferenciadas (Gillois *et al.*, 2021). Las BMDs confirman lo anteriormente expuesto, presentando un rango de dosis mayor al observado tras las 24 h de exposición aguda del TBBPA en la evaluación del co-cultivo. No se pudieron calcular los EC_{50} por los mismos motivos expuestos anteriormente en la evaluación de la exposición aguda al TBBPA.

En relación con la citotoxicidad de los PSNPs en estas exposiciones prolongadas, muestra un perfil muy similar al del TBBPA, observándose diferencias significativas únicamente en la concentración más elevada (50 $\mu\text{g/mL}$) tanto en el AB como en la CFDA-AM. Aun así, el potencial citotóxico ejercido por esta concentración es leve, y únicamente parece ser algo más perjudicial al evaluar la actividad metabólica.

Estos resultados se correlacionan bien con lo observado en líneas celulares endoteliales al exponerlas frente a diferentes nanopartículas en exposiciones prolongadas de hasta 28 días (Mrakovcic *et al.*, 2013). El impacto

de estos PSNPs también ha sido evaluado por Cui *et al.*, (2023) sobre este co-cultivo, observándose que son capaces de inducir cierta toxicidad, dañando la integridad de la barrera intestinal. Estos efectos parecen verse ligeramente paliados al aumentar la expresión de mucinas por parte de las HT29-MTX, en un proceso en el que participa el eje HO1/p38/IL-10 en las células Caco-2 (Cui *et al.*, 2023). Esto podría sugerir que a bajas concentraciones el co-cultivo es capaz de mantener su integridad gracias a la capa de mucus, en contraste con lo observado a 24 h, donde se apreciaban efectos estadísticamente significativos en todas las concentraciones de PSNPs evaluadas. Al igual que ocurría a 24 h, no se pudieron calcular ni los EC₅₀ ni las BMDs debido a estos PSNPs no ejercen ningún tipo de citotoxicidad relevante.

Una vez evaluado el potencial citotóxico por separado de ambos compuestos de estudio, se procedió a realizar la evaluación de las mezclas TBBPA-PSNPs. Se llevó a cabo exactamente la misma aproximación que en la determinación a 24 h, empleando las mismas combinaciones analizadas previamente, algunas de las cuales mostraron el potencial de ejercer efectos significativos con respecto a los presentes por separado. La evaluación de las diferentes mezclas TBBPA-PSNPs reveló que únicamente existían diferencias estadísticamente significativas con respecto al TBBPA de forma individual en el caso de 10 μ M, en todas sus combinaciones con PSNPs (1, 10 y 50 μ g/mL), y sólo para el AB. Por otro lado, no parece haber diferencias entre las distintas combinaciones, ejerciendo todas ellas un nivel de daño similar, independientemente de la concentración de PSNPs evaluada. El resto de las combinaciones de TBBPA-PSNPs no mostraron diferencias significativas, ni para el AB ni para la CFDA-AM.

Esto contrasta mucho con lo observado previamente a 24 h al evaluar las mismas mezclas. En ellas, las combinaciones de 10, 50 y 100 μ M de TBBPA junto con las concentraciones de PSNPs de 10 o 50 μ g/mL ejercían un efecto significativo sobre la integridad de la membrana plasmática al compararlas con la propia concentración individual de TBBPA. De igual forma, a nivel de la integridad de la actividad metabólica, sólo la combinación de 10 μ M de TBBPA + 50 μ g/mL ejercía efectos significativos. En esta exposición prolongada, podemos observar que no parece darse ninguna clase de efecto sobre la integridad de la membrana en ninguna de las combinaciones de estudio. Por el contrario, a nivel de la integridad metabólica, todas las combinaciones con 10 μ M de TBBPA ejercen un efecto significativo, independientemente de la concentración de PSNPs empleada en la mezcla.

Las BMDs obtenidas al evaluar las diferentes mezclas muestran que el TBBPA ejerce un efecto muy similar tanto en la evaluación con el AB como con la CFDA-AM, mientras que los PSNPs apenas ejercen efectos ni a nivel metabólico ni sobre la integridad de la membrana plasmática. Por lo tanto, las combinaciones TBBPA-PSNPs tienen un potencial toxicológico bajo, siendo el TBBPA el máximo responsable de los efectos citotóxicos observados, aspecto en común con la evaluación a 24 h.

Para estudiar la posible influencia de las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs sobre las rutas de estrés celular durante exposiciones prolongadas, se seleccionaron las concentraciones de 10 y 100 μ M, así como la de 50 μ g/mL de PSNPs, como se hizo previamente. También se seleccionó la concentración de 1 μ g/mL, ya que es la concentración más baja de PSNPs evaluada y en la que además se observaron diferencias estadísticamente significativas en combinación con 10 μ M de TBBPA en los ensayos de citotoxicidad.

La evaluación mediante Real-Time qRT-PCR de los genes relacionados con estrés oxidativo no mostró diferencias significativas en ninguno de los genes de estudio. A pesar de ello, al evaluar la expresión relativa de GSTP1 se puede observar cómo la condición de 100 μ M de TBBPA, así como sus combinaciones, provocan un aumento muy notable de la expresión de este gen. En el caso de NRF2, aunque no igual de acusado, se

repite este mismo fenómeno. Por último, en el caso de SOD2 puede intuirse un mayor aumento de su expresión génica en las combinaciones TBBPA-PSNPs, tanto en el caso de 10 μM como de 100 μM de TBBPA, en comparación con estos últimos. El hecho de que no se hayan dado diferencias significativas (especialmente sorprendente en el caso de GSTP1) se debe fundamentalmente al tratamiento estadístico, ya que al realizarse usando únicamente dos experimentos independientes ($n=2$), la potencia del test estadístico se ve reducida.

Aunque no hay muchos estudios realizados en tiempos de exposición tan prolongados en estas células intestinales, lo cierto es que sí que se ha determinado previamente la influencia de los PSNPs a largo plazo en las Caco-2. En dicho caso, los PSNPs eran capaces de alterar algunos de los genes relacionados con el estrés oxidativo (p. ej. SOD2), mientras que no tenían ninguna influencia sobre otros, como GSTP1 (Domenech *et al.*, 2021a). En nuestro caso, los PSNPs no parecen ejercer ningún efecto reseñable sobre la expresión génica. Por otro lado, parece que en las determinaciones en las que se evaluaban los efectos de la combinación de plomo con nanopartículas de óxido de zinc a largo plazo en ratas, se producía una sobreexpresión notable de NRF2 (Khayal *et al.*, 2021). Se ha visto que la activación de este gen está relacionada con los niveles de glutatión (Balas *et al.*, 2018), y puesto que NRF2 está involucrado en la activación de GSTP1, los resultados obtenidos serían coherentes con lo determinado previamente, indicando la existencia de condiciones de estrés oxidativo en la célula, especialmente notables en las condiciones en las que la concentración de 100 μM de TBBPA está presente.

Para profundizar más en los posibles daños por estrés en las células, se evaluó el potencial genotóxico y el daño por estrés oxidativo al ADN que ejercen las combinaciones TBBPA-PSNPs, así como los compuestos por separado. Para ello se volvió a emplear el ensayo Cometa alcalino, así como su modificación con FPG. También se evaluó la expresión de los genes relacionados con la reparación del daño al ADN analizados anteriormente.

El cometa alcalino reveló que únicamente la combinación de 100 μM de TBBPA + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSNPs producía roturas en la molécula de ADN. Sin embargo, el ensayo con FPG mostró que todas las combinaciones eran capaces de ejercer efectos de daño oxidativo sobre el ADN, siendo significativas con respecto al control. Adicionalmente, las combinaciones 10 μM de TBBPA, tanto con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSNPs, mostraron ser extremadamente significativas con respecto al TBBPA individual. Este hecho confirma que las combinaciones TBBPA-PSNPs pueden llegar a ser mucho más perjudiciales que los compuestos por separado y especialmente en exposiciones a largo plazo.

El hecho de que las combinaciones con 100 μM no resulten ser significativas frente a la condición individual, mientras que las combinaciones con 10 μM sí que demuestran serlo frente a ésta, coincide con lo observado en la evaluación de la citotoxicidad de dichas combinaciones en esta exposición prolongada. También vuelve a observarse que la condición de 100 μM de TBBPA resulta ser significativa tanto con respecto al control como frente a 10 μM , confirmándose su naturaleza similar a la de un radical libre (Szychowski *et al.*, 2016). Esta evaluación resulta ser muy interesante por dos motivos: 1. Las combinaciones con 100 μM no poseen diferencias significativas con respecto a la condición individual, dejando entrever que, en este caso, es el TBBPA el que ejerce los efectos tóxicos. 2. Las combinaciones con 10 μM son ciertamente más dañinas que la condición individual, mostrando unos niveles de daño oxidativo comparables a los ejercidos por la concentración de 100 μM de TBBPA.

En la evaluación a 24 h de estas combinaciones, no se observaron efectos significativos con respecto a la condición de TBBPA individual en ninguna de las combinaciones que se analizaron. En función de lo observado en la determinación del potencial de membrana mitocondrial en dichas evaluaciones, se sugirió que los PSNPs pudieran estar ejerciendo un cierto efecto protector, provocando hiperpolarización mitocondrial y no

observándose efectos sobre los niveles de ROS intracelular. En esta evaluación, se demuestra que las combinaciones, incluso en aquellas con una concentración de PSNPs relativamente baja (1 µg/mL) están provocando daños por estrés oxidativo al ADN, los cuales se han podido determinar cuando no fue posible en la exposición a 24 h, y son ciertamente mayores que los ejercidos por los compuestos por separado.

Puesto que esto sólo se observa en las combinaciones con 10 µM de TBBPA, no así en las de 100 µM, es muy probable que los efectos tóxicos sean ejercidos por el TBBPA, pero que estos PSNPs contribuyan de alguna manera a exacerbar los efectos del primero. Esto nos indica que no son necesarias concentraciones de TBBPA muy elevadas para acabar provocando efectos perniciosos en las células al evaluarse en mezclas con PSNPs.

La evaluación de los genes relacionados con la reparación del daño al ADN tampoco evidenció diferencias significativas en ninguna de las condiciones estudiadas, exceptuando el caso de 50 µg/mL en la expresión génica de ATR. En dicho caso, parece que esta concentración de PSNPs es capaz de regular negativamente a dicho gen, lo que podría indicar que el daño ejercido por las diferentes combinaciones en las que está presente esta concentración de PSNPs se debe a que los mecanismos de reparación del ADN y control del ciclo celular están siendo alterados de alguna forma. También puede observarse que tanto 100 µM de TBBPA, así como sus combinaciones, parecen ejercer un cierto aumento en la expresión de este mismo gen.

En PARP1 parece que ocurre algo parecido a lo observado en ATR, ya que en las condiciones en las que está presente 100 µM de TBBPA parece darse un ligero aumento de la expresión del gen, lo que puede explicar el aumento de la expresión génica presente en ATR ya que parece que las enzimas para las que codifican son capaces de interactuar entre ellas (Kedar *et al.*, 2008).

Por otra parte, se evaluaron algunos biomarcadores de células intestinales diferenciadas, concretamente TJP1, ABCB1 y ALPI. La primera, TJP1 (proteína de uniones estrechas/ocluyentes 1) codifica para la proteína *zonula occludens 1* (ZO-1), la cual se ve involucrada en la formación y mantenimiento de las uniones estrechas epiteliales (TJs) (González-Mariscal *et al.*, 2000). Estas TJs mantienen la integridad de la barrera intestinal y, al mismo tiempo, regulan la permeabilidad de iones, nutrientes y agua en la misma (Turner, 2006). El complejo multiproteico que origina estas TJs está compuesto por varias moléculas tales como ocludinas, claudinas y tricelulina (proteínas transmembrana), así como las proteínas *zonula occludens* (ZOs), localizadas en la periferia de la membrana (Hamada *et al.*, 2010). Éstas forman una barrera semipermeable entre las células epiteliales adyacentes, lo cual permite que se acaben delimitando los dominios de membrana apicales y basolaterales en la barrera intestinal (Lee, 2015).

El gen ABCB1 codifica para la glucoproteína-P, una proteína transportadora asociada a la membrana y que está localizada en el epitelio intestinal, además de en otros tejidos. Esta proteína está involucrada en la eliminación de numerosos compuestos xenobióticos, mediando en su secreción desde la sangre (o espacio basolateral) hacia el lumen intestinal (apical). También es capaz de limitar la absorción de diversos medicamentos, lo que se traduce en una menor biodisponibilidad de estos (Van Asperen *et al.*, 1998).

Por último, el gen ALPI codifica para la fosfatasa alcalina intestinal, la cual se encuentra en altas concentraciones en el ribete en cepillo de las células intestinales (enterocitos), fundamentalmente en el intestino delgado, y cataliza la hidrólisis de ésteres monofosfato con la liberación de fosfatos inorgánicos al medio (Shin *et al.*, 2014). Esta enzima está involucrada en la absorción de los ácidos grasos y también tiene un importante papel en el mantenimiento de la función de la homeostasis microbiana intestinal, así como de la función de la barrera intestinal a través de su habilidad para desfosforilar los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) (Santos *et al.*, 2022). Por otro lado, este papel de ALPI sobre la función del mantenimiento de la barrera intestinal se ha asociado con la regulación de la expresión de las proteínas de uniones estrechas. La

sobreexpresión de ALPI en las células Caco-2 y T84 potencia significativamente la expresión de ZO-1 y ZO-2 (Liu *et al.*, 2016).

La evaluación de la expresión de TJP1 no reveló diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las condiciones analizadas, sin embargo, parece darse una regulación negativa en la condición de 50 µg/mL de PSNPs. Esto ya se ha descrito previamente en el duodeno de modelos murinos (He *et al.*, 2022) y en células epiteliales pulmonares (Yang *et al.*, 2021) empleando PSNPs, mientras que en las Caco-2 se ha observado esto mismo al exponerlas frente a microplásticos de poliestireno (PSMPs) (Liu *et al.*, 2020). Por lo tanto, es posible que las concentraciones elevadas de PSNPs sean capaces de alterar la integridad de la barrera intestinal durante estas exposiciones prolongadas.

En cuanto a ABCB1, a pesar de que la única condición que resulta ser estadísticamente significativa es la correspondiente a la combinación de 100 µM de TBBPA + 1 µg/mL de PSNPs, lo cierto es que todas las condiciones en las que 100 µM de TBBPA está presente parecen mostrar una sobreexpresión de este gen. Como ya se ha indicado antes, ABCB1 codifica para la glucoproteína-P, involucrada en la eliminación de compuestos xenobióticos (Van Asperen *et al.*, 1998). El aumento en la expresión génica en estas condiciones, aunque no resulta ser estadísticamente significativo, nos indica que muy posiblemente las células promuevan la eliminación de compuestos extraños en la célula por este mecanismo.

Por último, en el caso del gen ALPI, al igual que lo que ocurría con TPJ1 no se observan diferencias significativas en ninguna de las condiciones evaluadas. Sin embargo, parece que todas las combinaciones TBBPA-PSNPs, especialmente aquellas con 100 µM de TBBPA, muestran una regulación negativa del gen, sugiriendo una alteración en el funcionamiento y/o desarrollo de las microvellosidades. Este hecho se ha observado también en el tratamiento con PSMPs, tanto de forma individual como en combinación con ácido okadaico, disminuyendo el número de microvellosidades en la superficie de la membrana plasmática de las células Caco-2 (Yan *et al.*, 2023). En este sentido, tanto estos mismos PSMPs como los PSNPs provocan la rotura de las microvellosidades en los enterocitos de pez cebra (Lei *et al.*, 2018) y en la pulga de agua (Chae *et al.*, 2018) respectivamente.

En nuestro caso, este efecto sólo se observa en las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs, no así en las condiciones individuales con PSNPs. Puesto que el potencial tóxico de estos PSNPs es bajo, como se ha venido observando hasta ahora, es muy posible que sea el TBBPA el que predisponga a las células, favoreciendo que los PSNPs dañen las microvellosidades posteriormente. Algo parecido se ha determinado en el pez gato punteado (*Ictalurus punctatus*), en el cual tanto la exposición de forma individual al bisfenol A (BPA) o a PSNPs provocaban la rotura de las microvellosidades intestinales, mientras que su combinación exacerbaba los daños histopatológicos (Zheng *et al.*, 2023). Esto indicaría que dichas combinaciones son capaces de dañar el ribete en cepillo de las células intestinales diferenciadas, disminuyendo por tanto la concentración de fosfatasa alcalina intestinal de estas.

La evaluación de la morfología de las células intestinales diferenciadas se llevó a cabo de forma complementaria a lo realizado hasta ahora, ya que la siembra de estas células intestinales sobre insertos *transwell* permite mimetizar las condiciones fisiológicas que se dan en las condiciones *in vivo*, posibilitando la formación de una barrera intestinal con una separación apical y basolateral bien diferenciadas. Estos estudios se realizaron usando la línea celular Caco-2, ya que se pretendía optimizar el protocolo de diferenciación celular sobre estos insertos realizando una primera aproximación con estas células y posteriormente continuarla empleando el co-cultivo una vez optimizado.

El estudio de la morfología celular se realizó tanto mediante microscopía confocal como mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). En el primer caso, se pretendía evaluar tanto la morfología de estas células una vez diferenciadas, como determinar si los PSNPs eran capaces de internalizarse en su interior. En el segundo, se pretendía evaluar la diferenciación celular, localizando aquellos elementos que sólo se presentan en células diferenciadas, tales como microvellosidades, interdigitaciones y uniones estrechas entre células.

Por un lado, la evaluación mediante microscopía confocal reveló que las diferentes combinaciones no parecen ejercer efectos sobre la morfología celular, ni a nivel del núcleo ni sobre el citoesqueleto de actina. Tanto las células sin tratar como las tratadas con las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs presentan una morfología similar, con núcleos grandes de diferentes tamaños y con microfilamentos de actina bien distribuidos delimitando la periferia celular. Sin embargo, se puede apreciar que los PSNPs son capaces de internalizarse y acumularse de forma efectiva en el interior celular, siendo especialmente destacable en el caso de 10 μM de TBBPA + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSNPs, incluso tras una exposición aguda de 24 h. Este comportamiento ya se ha descrito anteriormente para estos PSNPs en las células Caco-2 (Domenech *et al.*, 2021a), por lo que nuestras observaciones concuerdan con las previamente descritas. Probablemente esto se vea facilitado por el pequeño tamaño de estos PSNPs (0,04 μm) ya que cuanto menores son estas nanopartículas, más favorecido parece verse el proceso de internalización y acumulación (Forte *et al.*, 2016).

En el caso de esta última condición, se puede observar que los PSNPs parecen acumularse en el interior de vesículas de naturaleza endosomal. Estudios previos han determinado que estos PSNPs acaban por acumularse en el interior de los lisosomas de células eucariotas (Fröhlich *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018) debido a un mecanismo de defensa denominado efecto “caballo de Troya” (Wang *et al.*, 2013). Estos resultados parecen estar en sintonía con lo anteriormente expuesto, ya que los PSNPs se acumulan de una forma muy notable en el interior de las células, en estructuras compatibles con elementos del compartimento endosomal.

Para determinar si las células se encontraban efectivamente diferenciadas, se realizó la evaluación celular mediante el empleo de MET. Ésta muestra cómo las células sin tratar se encuentran diferenciadas y claramente polarizadas, presentando numerosas microvellosidades, así como la existencia de uniones estrechas entre las células adyacentes. También se pueden localizar algunos lisosomas, y sus mitocondrias poseen crestas mitocondriales bien definidas. En el caso de los tratamientos con las diferentes mezclas TBBPA-PSNPs, ambos casos presentan numerosos elementos relacionados con la vía de degradación celular.

En la condición 10 μM de TBBPA + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSNPs, parece haber un elevado número de cuerpos multilamelares, con algunos lisosomas dispersos por todo el citoplasma celular. En esta concentración aún se siguen detectando uniones estrechas e interdigitaciones entre las células, con mitocondrias y morfología celular similar a la presentada por las células sin tratar, a excepción de lo mencionado anteriormente. También es posible localizar cuerpos multivesiculares en el citoplasma. Por lo tanto, parece que los efectos que tiene esta combinación sobre las células se dan fundamentalmente a nivel de las vías de degradación y reciclaje de componentes celulares, apreciándose claramente el elevado número de elementos que participan en estas vías.

En el caso de 10 μM de TBBPA + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSNPs, se distinguen un mayor número de lisosomas, aunque también se aprecian cuerpos multilamelares y multivesiculares. Esto concuerda con lo observado durante la evaluación mediante microscopía confocal, ya que en ella se aprecia claramente cómo los PSNPs fluorescentes se internalizan de forma especialmente significativa. Durante la evaluación de esta condición,

aunque la morfología celular general no parece verse afectada y ser similar a la presente en las células control, no se localizaron uniones estrechas entre las células adyacentes observadas. Esto podría estar relacionado con la menor expresión del gen TJP1 realizada en el co-cultivo durante los 21 días de exposición continuada, en la cual, la condición de 50 µg/mL de PSNPs presentaba lo que parecía ser una regulación negativa de la expresión de dicho gen. Estudios previos han determinado que estos PSNPs son capaces de alterar la expresión de uniones estrechas, disminuyendo la expresión de estas tanto tras exposiciones agudas en células TM4 de ratón (Hu *et al.*, 2022), como en exposiciones prolongadas de 28 días en el tracto intestinal de ratones (Qiao *et al.*, 2021), evaluando esta misma concentración de PSNPs. Por lo tanto, es bastante probable que la exposición de los PSNPs altere de forma significativa la expresión de las uniones estrechas, alterando la integridad de la barrera intestinal, tal y como determinaron Cui *et al.*, (2023) en el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX.

También se determinó la localización de estructuras compatibles en tamaño y forma de los PSNPs caracterizados previamente en las células expuestas a las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs. En la combinación de 10 µM de TBBPA + 1 µg/mL de PSNPs, estos PSNPs se pueden localizar dispersos en el citoplasma celular, próximos fundamentalmente a los cuerpos multivesiculares. En el caso de la combinación 10 µM de TBBPA + 50 µg/mL de PSNPs, también se localizan en el citoplasma celular, agrupados en grandes cantidades en el interior de vesículas membranosas próximas a cuerpos multilamelares. Esto confirma lo observado previamente mediante inmunofluorescencia, además de ser compatible con lo previamente descrito por otros autores (Fröhlich *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018).

En conclusión, aunque es posible que los PSNPs empleados en nuestro estudio sean capaces de actuar como un “caballo de Troya”, funcionando como un vector que favorezca una mayor internalización celular del TBBPA, lo cierto es que parece ser un hecho bastante improbable. Nuestras evaluaciones parecen indicar que, si bien es cierto que los PSNPs parecen potenciar ligeramente los efectos del TBBPA en algunas de las combinaciones estudiadas, este efecto se debe más bien a los efectos citotóxicos iniciales ejercidos por el TBBPA. Éste predispondría a las células frente a los efectos ejercidos posteriormente por los PSNPs. Aun así, algunas combinaciones TBBPA-PSNPs ejercen unos más que notables efectos sobre el ADN, generando daños oxidativos que no deben ser desdeñados, especialmente en exposiciones prolongadas.

Por lo tanto, debería tenerse en cuenta la posible influencia de las diferentes combinaciones TBBPA-PSNPs sobre los diferentes modelos celulares, así como realizar estudios complementarios que permitan determinar si realmente estos PSNPs son capaces de adsorber el TBBPA sobre su superficie. Otro aspecto destacable es la posible influencia que pueda tener la biocorona sobre las interacciones TBBPA-PSNPs.

Estas evaluaciones resultan interesantes para determinar los potenciales efectos citotóxicos que son capaces de ejercer en situaciones tales como exposición ocupacional o accidental, pero también en situaciones fisiopatológicas. Aunque ya se ha comentado que las Caco-2 poseen una baja actividad del citocromo P-450 (Ozawa *et al.*, 2015; Küblbeck *et al.*, 2016), este modelo puede resultar útil para determinar los efectos que pueden llegar a ejercer las combinaciones TBBPA-PSNPs en condiciones patológicas o en células que ya se vean predispuestas o susceptibles de forma previa. En estas condiciones, es probable que las combinaciones TBBPA-PSNPs tengan un fuerte impacto sobre la viabilidad y supervivencia celular, así como sobre la integridad de la barrera intestinal.



CONCLUSIONES



- Tanto en el caso de las líneas celulares de peces como en las líneas celulares intestinales humanas, el TBBPA disminuye la viabilidad celular de una forma dependiente de la concentración en exposiciones agudas.
- Los efectos citotóxicos causados por los PSNPs tras la exposición durante 24 h son por lo general leves, aunque varían en las diferentes líneas celulares.
- Los efectos citotóxicos ejercidos por las combinaciones TBBPA-PSNPs no siguen un patrón definido en ninguno de los modelos celulares empleados.
- Las mezclas TBBPA-PSNPs no ejercen efectos relevantes sobre las vías de estrés oxidativo, pero pueden llegar a ser genotóxicas y/o provocar daños oxidativos al ADN, al igual que sobreexpresar genes relacionados con el metabolismo oxidativo y de reparación del daño al ADN tras su exposición aguda.
- Los resultados obtenidos en las RTgill-W1 son compatibles con los observados en las células Caco-2 y el co-cultivo Caco-2/HT29-MTX, por lo que los modelos celulares seleccionados son válidos para determinar los perfiles toxicológicos y mecanismos de toxicidad aguda de los compuestos de estudio.
- El co-cultivo Caco-2/HT29-MTX resiste mejor los efectos citotóxicos del TBBPA y los PSNPs en exposiciones prolongadas y, además, las mezclas TBBPA-PSNPs en estas exposiciones ejercen efectos desiguales, pero diferentes, de los observados tras 24 h.
- La exposición prolongada de las mezclas TBBPA-PSNPs genera efectos genotóxicos y de daño oxidativo al ADN moderados, destacando estos últimos, y al igual que el TBBPA y los PSNPs en altas concentraciones, alteran la expresión de genes de reparación del daño al ADN y de estrés oxidativo.
- Las combinaciones TBBPA-PSNPs son capaces de alterar la expresión génica de algunos de los genes que sólo se expresan en las células una vez diferenciadas, así como el TBBPA y los PSNPs en altas concentraciones.
- El modelo de barrera intestinal demuestra que las exposiciones agudas de las mezclas TBBPA-PSNPs alteran las vías de degradación de los componentes intracelulares, pero no la integridad de la barrera intestinal.
- El TBBPA determina el potencial tóxico de las diferentes mezclas, tanto en las exposiciones agudas como en las prolongadas.



BIBLIOGRAFÍA



- Abdulrazaq, Y., Abdulsalam, A., Larayetan Rotimi, A., Aliyu Abdulbasit, A., Clifford, O., Abdulazeez Abdulsalam, O., ... Umar M, S. (2020). Classification, Potential Routes and Risk of Emerging Pollutants/Contaminant. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.94447.
- Agüera, A., Martínez Bueno, M. J., Fernández-Alba, A. R. (2013). New trends in the analytical determination of emerging contaminants and their transformation products in environmental waters. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 3496–3515. doi: 10.1007/s11356-013-1586-0.
- Alaee, M., Wenning, R. J. (2002). The significance of brominated flame retardants in the environment: current understanding, issues and challenges. *Chemosphere*, 46(5). 579-582. doi: 10.1016/S0045-6535(01)00224-7.
- Alaee, M., Arias, P., Sjödin, A., Bergman, A. (2003). An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environment International*, 29(6), 683–689. doi: 10.1016/S0160-4120(03)00121-1.
- Alimi, O. S., Farner Budarz, J., Hernandez, L. M., Tufenkji, N. (2018). Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Environments: Aggregation, Deposition, and Enhanced Contaminant Transport. *Environmental Science and Technology*, 52(4), 1704–1724. doi: 10.1021/acs.est.7b05559.
- Almeida, M., Martins, M. A., Soares, A. M., Cuesta, A., Oliveira, M. (2019). Polystyrene nanoplastics alter the cytotoxicity of human pharmaceuticals on marine fish cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 69, 57–65. doi: 10.1016/j.etap.2019.03.019.
- Al-Salem, S. M., Lettieri, P., Baeyens, J. (2009). Recycling and recovery routes of plastic solid waste (PSW): a review. *Waste Management (New York, N.Y.)*, 29(10), 2625–2643. doi: 10.1016/j.wasman.2009.06.004.
- Altarawneh, M., Saeed, A., Al-Harashsheh, M., Dlugogorski, B. Z. (2019). Thermal decomposition of brominated flame retardants (BFRs): Products and mechanisms. *Progress in Energy and Combustion Science*, 70, 212-259. doi: 10.1016/j.peccs.2018.10.004.
- Amaze, N. H., Schnell, S., Sozeri, O., Otitolaju, A. A., Egonmwan, R. I., Arlt, V. M., Bury, N. R. (2015). Cytotoxic and genotoxic responses of the RTgill-W1 fish cells in combination with the yeast oestrogen screen to determine the sediment quality of Lagos lagoon, Nigeria. *Mutagenesis*, 30, 117–127. doi: 10.1093/mutage/geu032.
- An, W. F., Tolliday, N. (2010). Cell-based assays for high-throughput screening. *Molecular Biotechnology*. Jun;45(2):180-6. doi: 10.1007/s12033-010-9251-z.
- Andrady A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596–1605. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.05.030.
- Ankley, G. T., Bennett, R. S., Erickson, R. J., Hoff, D. J., Hornung, M. W., Johnson, R. D., Mount, D. R., Nichols, J. W., Russom, C. L., Schmieder, P. K., Serrano, J. A., Tietge, J. E., Villeneuve, D. L. (2010). Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(3), 730–741. doi: 10.1002/etc.34.
- Antunes, E., Vuppaladadiyam, A. K., Sarmah, A. K., Varsha, S. S. V., Pant, K. K., Tiwari, B., Pandey, A. (2021). Chapter Three - Application of biochar for emerging contaminant mitigation. Sarmah A.K (Ed.). En: *Advances in Chemical Pollution, Environmental Management and Protection*. Elsevier, (7). 65-91. Doi: 10.1016/bs.apmp.2021.08.003.

- Arango, M. T., Quintero-Ronderos, P., Castiblanco, J., Montoya-Ortíz, G. (2013). Chapter 45 - Cell culture and cell analysis. En: Anaya J.M., Shoenfeld Y., Rojas-Villarraga A., *et al.*, (Eds.). *Autoimmunity: From Bench to Bedside* [Internet]. Bogota (Colombia): El Rosario University Press; Jul 18. Chapter 45. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459464/>.
- Arnaud, A., Pommier de Santi, P. P., Garbe, L., Payan, H., Charpin, J. (1978). Polyvinyl chloride pneumoconiosis. *Thorax*, 33(1), 19–25. doi: 10.1136/thx.33.1.19.
- Azqueta A., Collins A. R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*. 87(6):949-68.
- Azqueta A., Arbillaga L., López de Cerain A., Collins A. (2013). Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG. *Mutagenesis*. 28(3):271-7.
- Balas, M., Dumitrache, F., Badea, M. A., Fleaca, C., Badoi, A., Tanasa, E., Dinischiotu, A. (2018). Coating Dependent In Vitro Biocompatibility of New Fe-Si Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 8(7), 495. doi: 10.3390/nano8070495.
- Bale, A. S., Kenyon, E., Flynn, T. J., Lipscomb, J. C., Mendrick, D. L., Hartung, T., Patton, G. W. (2014). Correlating in vitro data to in vivo findings for risk assessment. *ALTEX*, 31(1):79-90. doi: 10.14573/altex.1310011. Epub 2013 Nov 14.
- Banerjee, A., Shelver, W. L. (2021). Micro- and nanoplastic induced cellular toxicity in mammals: A review. *The Science of The Total Environment*, 755(Pt 2), 142518. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142518.
- Baptista-de-Souza, D., Rodrigues Tavares, L. R., Canto-de-Souza, L., Nunes-de-Souza, R. L., Canto-de-Souza, A. (2022). Behavioral, hormonal, and neural alterations induced by social contagion for pain in mice. *Neuropharmacology*, Feb 1;203:108878. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108878.
- Barnes, D. K., Galgani, F., Thompson, R. C., Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1526), 1985–1998. doi: 10.1098/rstb.2008.0205.
- Barrett, T. J., Corr, E. M., van Solingen, C., Schlamp, F., Brown, E. J., Koelwyn, G. J., Lee, A. H., Shanley, L. C., Spruill, T. M., Bozal, F., de Jong, A., Newman, A. A. C., Drenkova, K., Silvestro, M., Ramkhalawon, B., Reynolds, H. R., Hochman, J. S., Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Fisher, E. A., ... Moore, K. J. (2021). Chronic stress primes innate immune responses in mice and humans. *Cell Reports*, 36(10), 109595. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109595.
- Berger, E., Nassra, M., Atgié, C., Plaisancié, P., Géloën, A. (2017). Oleic Acid Uptake Reveals the Rescued Enterocyte Phenotype of Colon Cancer Caco-2 by HT29-MTX Cells in Co-Culture Mode. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1573. doi: 10.3390/ijms18071573.
- Bhattacharjee, S., Ershov, D., Islam, M. A., Kämpfer, A. M., Maslowska, K. A., van der Gucht, J., Gerrit M. A., T. M. Marcellis, A., Zuilhof, H., M. C. M. Rietjens, I. (2014). Role of membrane disturbance and oxidative stress in the mode of action underlying the toxicity of differently charged polystyrene nanoparticles. *RSC Advances*, 4: 19321–19330. doi: 10.1039/C3RA46869K.
- Bols, N. C., Barlian, A., Chirino-Trejo, M., Caldwell, S. J., Goegan, P., Lee, L. E. J. (1994). Development of a cell line from primary cultures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), gills. *Journal of Fish Diseases*, 17: 601-611. doi: 10.1111/j.1365-2761.1994.tb00258.x.

- Bols, N. C., Dayeh, V. R., Lee, L. E. J., Schirmer, K. (2005). Use of fish cell lines in toxicology of fish. En: Moon, T.W. & Mommsen, T.P. (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes-Environmental Toxicology*, pp. 43–84. Elsevier Science, Amsterdam.
- Boobis, A., Budinsky, R., Collie, S., Crofton, K., Embry, M., Felter, S., Hertzberg, R., Kopp, D., Mihlan, G., Mumtaz, M., Price, P., Solomon, K., Teuschler, L., Yang, R., Zaleski, R. (2011). Critical analysis of literature on low-dose synergy for use in screening chemical mixtures for risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 41(5), 369–383. doi: 10.3109/10408444.2010.543655.
- Borenfreund, E., Puerner, J. A. (1986). Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assayed in vitro. *Toxicology*, 39(2), 121–134. doi: 10.1016/0300-483x(86)90130-7.
- Bowen, C., Childers, G., Perry, C., Martin, N., McPherson, C. A., Lauten, T., Santos, J., Harry, G. J. (2020). Mitochondrial-related effects of pentabromophenol, tetrabromobisphenol A, and triphenyl phosphate on murine BV-2 microglia cells. *Chemosphere*, 255, 126919. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126919.
- Brandelli, A., Lopes, N. A., Boelter, J. F. (2017). Chapter 2 - Food applications of nanostructured antimicrobials. En: Grumezescu A.M. (Ed.). *Nanotechnology in the Agri-Food Industry. Food Preservation*. Academic Press. 35-74. doi: 10.1016/B978-0-12-804303-5.00002-X.
- Burden, N., Sewell, F., Andersen, M. E., Boobis, A., Chipman, J. K., Cronin, M. T., Hutchinson, T. H., Kimber, I., Whelan, M. (2015). Adverse Outcome Pathways can drive non-animal approaches for safety assessment. *Journal of Applied Toxicology*. Sep;35(9):971-5. doi: 10.1002/jat.3165.
- Bussolaro, D., Wright, S. L., Schnell, S., Schirmer, K., Bury, N. R., Arlt, V. M. (2019). Co-exposure to polystyrene plastic beads and polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants in fish gill (RTgill-W1) and intestinal (RTgutGC) epithelial cells derived from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Pollution*, 248, 706–714. doi: 10.1016/j.envpol.2019.02.066.
- Buttiglieri, G., Knepper, T. P. (2008). Removal of Emerging Contaminants in Wastewater Treatment: Conventional Activated Sludge Treatment. Barceló, D., Petrovic, M. (Eds.). En: *Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste. The Handbook of Environmental Chemistry*, vol 5 / 5S / 5S/2. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-540-79210-9_1.
- Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J. L. (2006). One-electron oxidation of DNA and inflammation processes. *Nature Chemical Biology*, 2(7), 348–349. doi: 10.1038/nchembio0706-348.
- Canadian Council on Animal Care (CACC) (2022). Three Rs and Ethics: The Three Rs - Replacement, Reduction, Refinement. Ottawa, Canada. <https://ccac.ca/en/three-rs-and-ethics/the-three-rs.html>. Consultado el 07 de noviembre 2022.
- Carr, S.A., Liu, J., Tesoro, A. G. (2016). Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Research*, 91, 174–182. doi: 10.1016/j.watres.2016.01.002.
- Casella, G. (2008). *Statistical Design*. Springer. New York, (NY).
- Castaño A., Gómez-Lechón M. J. (2005). Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: a literature survey. *Toxicology in Vitro*. Aug;19(5):695-705. doi: 10.1016/j.tiv.2005.04.002.
- Cedergreen, N. (2014). Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PloS One*, 9(5), e96580. doi: 10.1371/journal.pone.0096580.

- Chae, Y., Kim, D., Kim, S. W., An, Y. J. (2018). Trophic transfer and individual impact of nano-sized polystyrene in a four-species freshwater food chain. *Scientific Reports*, 8(1), 284. doi: 10.1038/s41598-017-18849-y.
- Chatterjee, N., Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5), 235–263. doi: 10.1002/em.22087.
- Chen, B. P., Li, M., Asaithamby, A. (2012). New insights into the roles of ATM and DNA-PKcs in the cellular response to oxidative stress. *Cancer Letters*, 327(1-2), 103–110. doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.004.
- Chiorcea-Paquim, A. M. (2022). 8-oxoguanine and 8-oxodeoxyguanosine Biomarkers of Oxidative DNA Damage: A Review on HPLC-ECD Determination. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(5), 1620. doi: 10.3390/molecules27051620.
- Choi, J. S., Lee, Y. J., Kim, T. H., Lim, H. J., Ahn, M. Y., Kwack, S. J., Kang, T. S., Park, K. L., Lee, J., Kim, N. D., Jeong, T. C., Kim, S. G., Jeong, H. G., Lee, B. M., Kim, H. S. (2011). Molecular Mechanism of Tetrabromobisphenol A (TBBPA)-induced Target Organ Toxicity in Sprague-Dawley Male Rats. *Toxicological Research*, 27(2), 61–70. doi: 10.5487/TR.2011.27.2.061.
- Cimprich, K. A., Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(8), 616–627. doi: 10.1038/nrm2450.
- Clemenson, C., Nordin-Andersson, M., Bjerregaard, H. F., Clausen, J., Forsby, A., Gustafsson, H., Hansson, U., Isomaa, B., Jørgensen, C., Kolman, A., Kotova, N., Krause, G., Kristen, U., Kurppa, K., Romert, L., Scheers, E. (2002). Development of an in vitro test battery for the estimation of acute human systemic toxicity: An outline of the EDIT project. *Evaluation-guided Development of New In Vitro Test Batteries. Alternatives to laboratory animals: ATLA*, 30(3), 313–321. doi: 10.1177/026119290203000309.
- Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, 142, (3). 185-194. doi: 10.1016/S0378-4274(03)00068-7.
- Clift, M. J., Bhattacharjee, S., Brown, D. M., Stone, V. (2010). The effects of serum on the toxicity of manufactured nanoparticles. *Toxicology Letters*, 198(3), 358–365. doi: 10.1016/j.toxlet.2010.08.002.
- Cordelli, E., Bignami, M., Pacchierotti, F. (2021). Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research (Camb)* 10, 68–78. doi: 10.1093/toxres/tfaa093.
- Cortés, C., Domenech, J., Salazar, M., Pastor, S., Marcos, R., Hernandez, A. (2019). Nanoplastics as potential environmental health factors. Effects of polystyrene nanoparticles on the human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Environmental Science: Nano*. 7:272–285. doi: 10.1039/c9en00523d.
- Covaci, A., Voorspoels, S., Abdallah, M. A. E., Geens, T., Harrad, S., Law R. J. (2009). Analytical and environmental aspects of the flame retardant tetrabromobisphenol-A and its derivatives. *Journal of Chromatography A*, 1216 (3). 346-363. doi: 10.1016/j.chroma.2008.08.035.
- Creton, S., Aardema, M. J., Carmichael, P. L., Harvey, J. S., Martin, F. L., Newbold, R. F., O'Donovan, M. R., Pant, K., Poth, A., Sakai, A., Sasaki, K., Scott, A. D., Schechtman, L. M., Shen, R. R., Tanaka, N., Yasaei, H. (2012). Cell transformation assays for prediction of carcinogenic potential: state of the science and future research needs. *Mutagenesis*, 27(1), 93–101. doi: 10.1093/mutage/ger053.
- Cui, M., He, Q., Wang, Z., Yu, Y., Gao, H., Liu, Z., Peng, H., Wang, H., Zhang, X., Li, D., Chen, L., Xing, X., Xiao, Y., Chen, W., Wang, Q. (2023). Mucin2 regulated by Ho1/p38/IL-10 axis plays a protective role in polystyrene

- nanoplastics-mediated intestinal toxicity. *Environmental Pollution* (Barking, Essex: 1987), 330, 121808. doi: 10.1016/j.envpol.2023.121808.
- da Costa, J. P., Santos, P. S. M., Duarte, A. C., Rocha-Santos, T. (2016). (Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects. *The Science of The Total Environment*, 566-567, 15–26. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.041.
- Darnerud, P. O. (2003). Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environment International*, 29(6), 841-853. doi: 10.1016/S0160-4120(03)00107-7.
- Davidovic, L., Vodenicharov, M., Affar, E. B., Poirier, G. G. (2001). Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Experimental Cell Research*, 268(1), 7–13. doi: 10.1006/excr.2001.5263.
- de Wit, C. A. (2002). An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere*, 46(5), 583–624. doi: 10.1016/S0045-6535(01)00225-9.
- Deville, S., Honrath, B., Tran, Q. T. D., Fejer, G., Lambrichts, I., Nelissen, I., Dolga, A. M., Salvati, A. (2020). Time-resolved characterization of the mechanisms of toxicity induced by silica and amino-modified polystyrene on alveolar-like macrophages. *Archives of Toxicology*, 94(1), 173–186. doi: 10.1007/s00204-019-02604-5.
- Dey, S., Bano, F., Malik, A. (2019). 1 - Pharmaceuticals and personal care product (PPCP) contamination—a global discharge inventory. Prasad M.N.V., Vithanage M., Kapley A. (Eds.). *Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology*. Butterworth-Heinemann. 1-26. doi: 10.1016/B978-0-12-816189-0.00001-9.
- Di Marzo, N., Chisci, E., Giovannoni, R. (2018). The Role of Hydrogen Peroxide in Redox-Dependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells. *Cells*, 7(10), 156. doi: 10.3390/cells7100156.
- Dodson, M., de la Vega, M. R., Cholanians, A. B., Schmidlin, C. J., Chapman, E., Zhang, D. D. (2019). Modulating NRF2 in Disease: Timing Is Everything. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 59, 555–575. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021856.
- Domenech, J., Hernández, A., Rubio, L., Marcos, R., Cortés, C. (2020). Interactions of polystyrene nanoplastics with in vitro models of the human intestinal barrier. *Archives of Toxicology*, 94(9), 2997–3012. doi: 10.1007/s00204-020-02805-3.
- Domenech, J., de Britto, M., Velázquez, A., Pastor, S., Hernández, A., Marcos, R., Cortés, C. (2021a). Long-Term Effects of Polystyrene Nanoplastics in Human Intestinal Caco-2 Cells. *Biomolecules*, 11(10), 1442. doi: 10.3390/biom11101442.
- Domenech, J., Cortés, C., Vela, L., Marcos, R., Hernández, A. (2021b). Polystyrene Nanoplastics as Carriers of Metals. Interactions of Polystyrene Nanoparticles with Silver Nanoparticles and Silver Nitrate, and Their Effects on Human Intestinal Caco-2 Cells. *Biomolecules*, 11(6), 859. doi: 10.3390/biom11060859.
- Domínguez-Gerpe, L., Rey-Méndez, M. (2001). Alterations induced by chronic stress in lymphocyte subsets of blood and primary and secondary immune organs of mice. *BMC Immunology*, 2:7. doi: 10.1186/1471-2172-2-7.

- Dulio, V., van Bavel, B., Brorström-Lundén, E., Harmsen, J., Hollender, J., Schlabach, M., Slobodnik, J., Thomas, K., Koschorreck, J. (2018). Emerging pollutants in the EU: 10 years of NORMAN in support of environmental policies and regulations. *Environmental Sciences Europe*, 30(1), 5. doi: 10.1186/s12302-018-0135-3.
- Dumont, J., Ewart, D., Mei, B., Estes, S., Kshirsagar, R. (2016). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, Dec;36(6):1110-1122. doi: 10.3109/07388551.2015.1084266.
- Dunnick, J. K., Morgan, D. L., Elmore, S. A., Gerrish, K., Pandiri, A., Ton, T. V., Shockley, K. R., Merrick, B. A. (2017). Tetrabromobisphenol A activates the hepatic interferon pathway in rats. *Toxicology Letters*, 266, 32–41. doi: 10.1016/j.toxlet.2016.11.019.
- Dusinska, M., Collins, A.R. (1996). Detection of Oxidised Purines and UV-induced Photoproducts in DNA of Single Cells, by Inclusion of Lesion-specific Enzymes in the Comet Assay. *Alternatives to Laboratory Animals*, 24, 405 - 411.
- Ebele, A. J., Abdallah, M. A. E., Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, 3(1). 1-16. doi: 10.1016/j.emcon.2016.12.004.
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *ASSAY and Drug Development Technologies*, May;12(4):207-18. doi: 10.1089/adt.2014.573.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J. C., Pieters, R., Kleiner, J. (2002). Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, Feb-Mar;40(2-3):193-236. doi: 10.1016/s0278-6915(01)00118-1.
- Ekwall, B. (1995). The basal cytotoxicity concept. En: Goldberg, A.M., van Zutphen, L.F.M. (Eds.), *Alternative Methods in Toxicology and the Life Sciences, The World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: Education, Researches, Testing*, vol. 11. Mary Ann Liebert, New York, pp. 721–725.
- Eljarrat, E., Feo, M. L., Barceló, D. (2011). Degradation of Brominated Flame Retardants. Eljarrat, E., Barceló, D. (Eds.). En: *Brominated Flame Retardants. The Handbook of Environmental Chemistry*, 16. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/698_2010_96.
- Eruslanov, E., Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 594, 57–72. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4.
- EU Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL ECVAM) (2022a). Alternative methods for toxicity testing: validated test methods - health effects. Joint Research Centre. Ispra, Italy. https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eu-reference-laboratory-alternatives-animal-testing-eurl-ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/validated-test-methods-health-effects_en. Consultado el 08 de noviembre de 2022.
- EU Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL ECVAM) (2022b). Frequently Asked Questions – General. Joint Research Centre. Ispra, Italy. https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eu-reference-laboratory-alternatives-animal-testing-eurl-ecvam/eurl-ecvam-faqs/frequently-asked-questions-general_en. Consultado el 08 de noviembre de 2022.
- European Chemical Agency (ECHA). (2022). Substance information. Substance infocard: 2,2',6,6'-tetrabromo-4,4'-isopropylidenediphenol. European Chemicals Agency. Helsinki, Finland.

<https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.001.125>. Consultado el 19 de diciembre de 2022.

European Commission (EC) (2022a). Chemicals: REACH. Introduction. Directorate General for Environment. Brussel, Belgium. https://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_en.htm. Consultado el 07 de noviembre 2022.

European Commission (EC) (2022b). Chemicals: REACH. Implementation. Directorate General for Environment. Brussel, Belgium. https://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/implementation_en.htm. Consultado el 07 de noviembre 2022.

European Commission (EC) (2022c). Chemicals: REACH. REACH and Animal Testing. Directorate General for Environment. Belgium, Brussel. https://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/animal_en.htm. Consultado el 07 de noviembre 2022.

European Commission (EC) (2022d). Chemicals: Persistent Organic Pollutants (POPs). Brussel, Belgium. https://ec.europa.eu/environment/chemicals/international_conventions/index_en.htm. Consultado el 15 de diciembre 2022.

European Commission (EC) (2022e). Chemicals: Combination effects of chemicals. Directorate General for Environment. Brussel, Belgium. https://ec.europa.eu/environment/chemicals/effects/effects_en.htm. Consultado el 17 de diciembre 2022.

Fedi, A., Vitale, C., Ponschin, G., Ayehunie, S., Fato, M., Scaglione, S. (2021). In vitro models replicating the human intestinal epithelium for absorption and metabolism studies: A systematic review. *Journal of Controlled Release*, 335, 247–268. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.05.028.

Feiteiro, J., Mariana, M., Cairrão, E. (2021). Health toxicity effects of brominated flame retardants: From environmental to human exposure. *Environmental Pollution*, 285. doi: 10.1016/j.envpol.2021.117475.

Ferruzza, S., Rossi, C., Scarino, M. L., & Sambuy, Y. (2012). A protocol for differentiation of human intestinal Caco-2 cells in asymmetric serum-containing medium. *Toxicology in Vitro*, 26(8), 1252–1255. doi: 10.1016/j.tiv.2012.01.008.

Fischer, M. (2017). Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*, 36(28), 3943–3956. doi: 10.1038/onc.2016.502.

Fogh, J., Trempe, G. (1975). New human tumor cell lines. En: Fogh J. (Ed.). *Human tumor cell in vitro*, 1st ed. Springer, New York, pp 115–159. doi: 10.1007/978-1-4757-1647-4_5.

Fogh, J., Fogh, J.M., Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. Jul;59(1):221-6. doi: 10.1093/jnci/59.1.221.

Forte, M., Iachetta, G., Tussellino, M., Carotenuto, R., Prisco, M., De Falco, M., Laforgia, V., Valiante, S. (2016). Polystyrene nanoparticles internalization in human gastric adenocarcinoma cells. *Toxicology in Vitro*, 31, 126–136. doi: 10.1016/j.tiv.2015.11.006.

- Frederiksen, M., Vorkamp, K., Thomsen, M., Knudsen, L. E. (2009). Human internal and external exposure to PBDEs--a review of levels and sources. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212(2), 109–134. doi: 10.1016/j.ijheh.2008.04.005.
- Freitas, C., Müller, R. H. (1998). Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNt) dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, 168, 221-229.
- Fröhlich E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5577–5591. doi: 10.2147/IJN.S36111.
- Fröhlich, E., Meindl, C., Roblegg, E., Ebner, B., Absenger, M., Pieber, T. R. (2012). Action of polystyrene nanoparticles of different sizes on lysosomal function and integrity. *Particle and Fibre Toxicology*, 9, 26. doi: 10.1186/1743-8977-9-26.
- Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., Samali, A. (2010). Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*, 2010, 214074. doi: 10.1155/2010/214074.
- Fuller, R., Landrigan, P. J., Balakrishnan, K., Bathan, G., Bose-O'Reilly, S., Brauer, M., Caravanos, J., Chiles, T., Cohen, A., Corra, L., Cropper, M., Ferraro, G., Hanna, J., Hanrahan, D., Hu, H., Hunter, D., Janata, G., Kupka, R., Lanphear, B., Lichtveld, M., ... Yan, C. (2022). Pollution and health: a progress update. *The Lancet. Planetary Health*, 6(6), e535–e547. doi: 10.1016/S2542-5196(22)00090-0.
- Gagnon, M., Zihler Berner, A., Chervet, N., Chassard, C., Lacroix, C. (2013). Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion. *Journal of Microbiological Methods*, Sep;94(3):274-9. doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.027.
- Ganassin, R. C., Schirmer, K., Bols, N.C. (2000). Cell and Tissue Culture. The laboratory fish. En: Ostrand GK. San Diego: Academic Press, 631-651.
- Gao, B. (2022). Chapter 1 – Introduction. Gao B. (Ed.). En: *Emerging Contaminants in Soil and Groundwater Systems*. Elsevier. 1-4. doi: 10.1016/B978-0-12-824088-5.00002-1.
- Gautam, K., Anbumani, S. (2020). Chapter 19 - Ecotoxicological effects of organic micro-pollutants on the environment. Varjani, S., Pandey, A., Tyagi, R. D., Ngo, H. H., Larroche, C. (Eds.). En: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 481-501. doi: 10.1016/B978-0-12-819594-9.00019-X.
- Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., Umlauf, G., Nadal M., van der Ploeg, M., van de Zee, S. E. A. T. M., Ritsema, C.J. (2015). Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *International Soil and Water Conservation Research*, 3, (1). 57-65. doi: 10.1016/j.iswcr.2015.03.002.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), e1700782. doi: 10.1126/sciadv.1700782.
- Gigault, J., El Hadri, H., Nguyen, B., Grassl, B., Roweczyk, L., Tufenkji, N., Feng, S., Wiesner, M. (2021). Nanoplastics are neither microplastics nor engineered nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 16(5), 501–507. doi: 10.1038/s41565-021-00886-4.
- Gillois, K., Lévêque, M., Théodorou, V., Robert, H., Mercier-Bonin, M. (2018). Mucus: An Underestimated Gut Target for Environmental Pollutants and Food Additives. *Microorganisms*, 6(2), 53. doi: 10.3390/microorganisms6020053.

- Gillois, K., Stoffels, C., Leveque, M., Fourquaux, I., Blesson, J., Mils, V., Cambier, S., Vignard, J., Terrisse, H., Mirey, G., Audinot, J. N., Theodorou, V., Ropers, M. H., Robert, H., Mercier-Bonin, M. (2021). Repeated exposure of Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX intestinal cell models to (nano)silver in vitro: Comparison of two commercially available colloidal silver products. *The Science of The Total Environment*, 754, 142324. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142324.
- González-Mariscal, L., Betanzos, A., Avila-Flores, A. (2000). MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 11(4), 315–324. doi: 10.1006/scdb.2000.0178.
- Goswami, M., Yashwanth, B. S., Trudeau, V., Lakra, W. S. (2022). Role and relevance of fish cell lines in advanced in vitro research. *Molecular Biology Reports*, Mar;49(3):2393-2411. doi: 10.1007/s11033-021-06997-4.
- Grasselli, E., Cortese, K., Fabbri, R., Smerilli, A., Vergani, L., Voci, A., Gallo, G., Canesi, L. (2014). Thyromimetic actions of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in steatotic FaO rat hepatoma cells. *Chemosphere*, 112, 511–518. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.03.114.
- Greven, A. C., Merk, T., Karagöz, F., Mohr, K., Klapper, M., Jovanović, B., Palić, D. (2016). Polycarbonate and polystyrene nanoplastic particles act as stressors to the innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(12), 3093–3100. doi: 10.1002/etc.3501.
- Grobelak, A., Kowalska, A. (2022). Chapter 2 - Emerging environmental contaminants—current status, challenges, and technological solutions. Sarma H., Dominguez D. C. Lee W. Y. (Eds.). En: *Emerging Contaminants in the Environment*. Elsevier. 39-53. doi: 10.1016/B978-0-323-85160-2.00010-X.
- Guerra, P., Alae, M., Eljarrat, E., Barceló, D. (2010). Introduction to Brominated Flame Retardants: Commercially Products, Applications, and Physicochemical Properties. Eljarrat, E., Barceló, D. (Eds.). En: *Brominated Flame Retardants. The Handbook of Environmental Chemistry*, 16. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/698_2010_93.
- Guo, Z., Kozlov, S., Lavin, M. F., Person, M. D., Paull, T. T. (2010). ATM activation by oxidative stress. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6003), 517–521. doi: 10.1126/science.1192912.
- Halappanavar, S., van den Brule, S., Nymark, P., Gaté, L., Seidel, C., Valentino, S., Zhernovkov, V., Høgh Danielsen, P., De Vizcaya, A., Wolff, H., Stöger, T., Boyadziev, A., Poulsen, S. S., Sørli, J. B., Vogel, U. (2020). Adverse outcome pathways as a tool for the design of testing strategies to support the safety assessment of emerging advanced materials at the nanoscale. *Particle and Fibre Toxicology*, 17(1), 16. doi: 10.1186/s12989-020-00344-4.
- Hamada, K., Shitara, Y., Sekine, S., Horie, T. (2010). Zonula Occludens-1 alterations and enhanced intestinal permeability in methotrexate-treated rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 66(6), 1031–1038. doi: 10.1007/s00280-010-1253-9.
- Hammer, J., Kraak, M.H., Parsons, J.R. (2012). Plastics in the marine environment: the dark side of a modern gift. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 220, 1–44. doi: 10.1007/978-1-4614-3414-6_1.
- Hanrahan G., Zhu J., Gibani S., Patil D. G. (2005). *Chemometrics and Statistics | Experimental Design*. En: *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*. Elsevier. pp. 8-13.

- Hardy, M. L. (2004). A comparison of the fish bioconcentration factors for brominated flame retardants with their nonbrominated analogues. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(3), 656–661. doi: 10.1897/03-03.
- Hartung, T. (2010). Lessons learned from alternative methods and their validation for a new toxicology in the 21st century. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Feb;13(2-4):277-90. doi: 10.1080/10937404.2010.483945.
- Hartung, T. (2011). From alternative methods to a new toxicology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Apr;77(3):338-49. doi: 10.1016/j.ejpb.2010.12.027.
- Hays, S. M., Kirman, C. R. (2019). Biomonitoring Equivalents (BEs) for tetrabromobisphenol A. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 102, 108–114. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.12.014.
- He, Y., Li, J., Chen, J., Miao, X., Li, G., He, Q., Xu, H., Li, H., Wei, Y. (2020). Cytotoxic effects of polystyrene nanoplastics with different surface functionalization on human HepG2 cells. *The Science of The Total Environment*, 723, 138180. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138180.
- He, Y., Li, Z., Xu, T., Luo, D., Chi, Q., Zhang, Y., Li, S. (2022). Polystyrene nanoplastics deteriorate LPS-modulated duodenal permeability and inflammation in mice via ROS driven-NF- κ B/NLRP3 pathway. *Chemosphere*, 307(Pt 1), 135662. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.135662.
- Hernández, L. M., Yousefi, N., Tufenkji, N. (2017). Are there nanoplastics in your personal care products? *Environmental Science and Technology Letters*, 4(7), 280-285. doi: 10.1021/acs.estlett.7b00187.
- Hernández, L. M., Xu, E. G., Larsson, H. C. E., Tahara, R., Maisuria, V. B., Tufenkji, N. (2019). Plastic Teabags Release Billions of Microparticles and Nanoparticles into Tea. *Environmental Science and Technology*, 53(21), 12300–12310. doi: 10.1021/acs.est.9b02540.
- Hesler, M., Aengenheister, L., Ellinger, B., Drexel, R., Straskraba, S., Jost, C., Wagner, S., Meier, F., von Briesen, H., Büchel, C., Wick, P., Buerki-Thurnherr, T., Kohl, Y. (2019). Multi-endpoint toxicological assessment of polystyrene nano- and microparticles in different biological models in vitro. *Toxicology in Vitro* 61, 104610. doi: 10.1016/j.tiv.2019.104610.
- Hidalgo, I. J., Raub, T. J., Borchartdt, R. T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96(3), 736–749.
- Holland, J. W., Taylor, G. W., & Rowley, A. F. (1999). The eicosanoid generating capacity of isolated cell populations from the gills of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 122(3), 297–306. doi: 10.1016/s0742-8413(98)10127-5.
- Hu, R., Yao, C., Li, Y., Qu, J., Yu, S., Han, Y., Chen, G., Tang, J., Wei, H. (2022). Polystyrene nanoplastics promote CHIP-mediated degradation of tight junction proteins by activating IRE1 α /XBP1s pathway in mouse Sertoli cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 248, 114332. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114332.
- Huang, W., Yin, H., Yang, Y., Jin, L., Lu, G., Dang, Z. (2021). Influence of the co-exposure of microplastics and tetrabromobisphenol A on human gut: Simulation in vitro with human cell Caco-2 and gut microbiota. *The Science of The Total Environment*, 778, 146264. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146264.
- Hunter, R.J. (2013). *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*. Academic Press.

- Hutzinger, O, Thoma, H. (1987). Polybrominated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: the flame retardant issue. *Chemosphere*, 16(8-9). 1877–1880. doi: 10.1016/0045-6535(87)90181-0.
- International Program on Chemical Safety (IPCS) (1995). *Environmental Health Criteria* no. 172. Tetrabromobisphenol A and derivatives. WHO, Geneva.
- Iyare, P. U., Ouki, S. K., Bond, T. (2020). Microplastics removal in wastewater treatment plants: a critical review. *Environmental Science: Water Research and Technology*, 6(1). doi: 10.1039/D0EW00397B.
- Jaganjac, M., Milkovic, L., Sunjic, S. B., Zarkovic, N. (2020). The NRF2, Thioredoxin, and Glutathione System in Tumorigenesis and Anticancer Therapies. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 9(11), 1151. doi: 10.3390/antiox9111151.
- Jakobsson, K., Thuresson, K., Rylander, L., Sjödin, A., Hagmar, L., Bergman, A. (2002). Exposure to polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A among computer technicians. *Chemosphere*, 46(5), 709–716. doi: 10.1016/S0045-6535(01)00235-1.
- Jiang, J., Oberdörster, G., Biswas, P. (2009). Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 11, 77-89.
- Jiang, X. Q., Mei, X. D., Feng, D. (2016). Air pollution and chronic airway diseases: what should people know and do? *Journal of Thoracic Disease*, Jan;8(1): E31-40. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.11.50.
- Jiang, B., Kauffman, A. E., Li, L., McFee, W., Cai, B., Weinstein, J., Lead, J. R., Chatterjee, S., Scott, G. I., Xiao, S. (2020). Health impacts of environmental contamination of micro- and nanoplastics: a review. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 25(1), 29. doi: 10.1186/s12199-020-00870-9.
- Jimeno-Romero, A., Gwinner, F., Müller, M., Mariussen, E., Soto, M., Kohl, Y. (2021). Sea Bass Primary Cultures versus RTgill-W1 Cell Line: Influence of Cell Model on the Sensitivity to Nanoparticles. *Nanomaterials* 11, 3136. doi: 10.3390/nano11113136.
- Joshi, D. C., Bakowska, J. C. (2011). Determination of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in live rat cortical neurons. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (51), 2704. doi: 10.3791/2704.
- Kawano, A., Haiduk, C., Schirmer, K., Hanner, R., Lee, L., Dixon, B., Bols, N. (2011). Development of a rainbow trout intestinal epithelial cell line and its response to lipopolysaccharide. *Aquaculture Nutrition*, 17: e241-e252. doi: 10.1111/j.1365-2095.2010.00757.x.
- Kay, K. (1977). Polybrominated biphenyls (PBB) environmental contamination in Michigan, 1973–1976. *Environmental Research*, 13(1). 74-93. doi: 10.1016/0013-9351(77)90006-8.
- Kedar, P. S., Stefanick, D. F., Horton, J. K., Wilson, S. H. (2008). Interaction between PARP-1 and ATR in mouse fibroblasts is blocked by PARP inhibition. *DNA Repair*, 7(11), 1787–1798. doi: 10.1016/j.dnarep.2008.07.006.
- Kelishadi, R., Mirghaffari, N., Poursafa, P., Gidding, S. S. (2009). Lifestyle and environmental factors associated with inflammation, oxidative stress and insulin resistance in children. *Atherosclerosis*, Mar;203(1):311-9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.022.
- Kelishadi, R., Poursafa, P. (2010). Air pollution and non-respiratory health hazards for children. *Archives of Medical Science*, Aug 30;6(4):483-95. doi: 10.5114/aoms.2010.14458.

- Kemmler, S., Herzke, D., Law R. J. (2009). Brominated flame retardants in the European chemicals policy of REACH—Regulation and determination in materials. *Journal of Chromatography A*, 1216(3). 320-333. doi: 10.1016/j.chroma.2008.05.085.
- Khayal, E. E., Ibrahim, H. M., Shalaby, A. M., Alabiad, M. A., El-Sheikh, A. A. (2021). Combined lead and zinc oxide-nanoparticles induced thyroid toxicity through 8-OHdG oxidative stress-mediated inflammation, apoptosis, and Nrf2 activation in rats. *Environmental Toxicology*, 36(12), 2589–2604. doi: 10.1002/tox.23373.
- Kim, A. H., Chun, H. J., Lee, S., Kim, H. S., Lee, J. (2017). High dose tetrabromobisphenol A impairs hippocampal neurogenesis and memory retention. *Food and Chemical Toxicology*, 106(Pt A), 223–231. doi.org: 10.1016/j.fct.2017.05.053.
- Kim, J., Koo, B. K., Knoblich, J. A. (2020). Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21, 571–584 doi: 10.1038/s41580-020-0259-3.
- Kitamura, S., Jinno, N., Ohta, S., Kuroki, H., Fujimoto, N. (2002). Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293(1), 554–559. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00262-0.
- Ko, H. L., Ren, E. C. (2012). Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription. *Biomolecules*, 2(4), 524–548. doi: 10.3390/biom2040524.
- Koelmans, A. A., Besseling, E., Shim, W. J. (2015). Nanoplastics in the Aquatic Environment. *Critical Review*. In: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (eds) *Marine Anthropogenic Litter*. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-16510-3_12.
- Küblbeck, J., Hakkarainen, J. J., Petsalo, A., Vellonen, K. S., Tolonen, A., Reponen, P., Forsberg, M. M., Honkakoski, P. (2016). Genetically Modified Caco-2 Cells With Improved Cytochrome P450 Metabolic Capacity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(2), 941–949. doi: 10.1016/S0022-3549(15)00187-2.
- Kühn, S., Bravo Rebolledo, E.L., van Franeker, J.A. (2015). Deleterious Effects of Litter on Marine Life. Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.). En: *Marine Anthropogenic Litter*. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-16510-3_4.
- Kulkarni, A., Das, K. C. (2008). Differential roles of ATR and ATM in p53, Chk1, and histone H2AX phosphorylation in response to hyperoxia: ATR-dependent ATM activation. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294(5), L998–L1006. doi: 10.1152/ajplung.00004.2008.
- Kültz D. (2003). Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *The Journal of Experimental Biology*, 206(Pt 18), 3119–3124. doi: 10.1242/jeb.00549.
- Kültz D. (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology*, 67, 225–257. doi: 10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635.
- Lai, H., Liu, X., Qu, M. (2022). Nanoplastics and Human Health: Hazard Identification and Biointerface. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 12(8), 1298. doi: 10.3390/nano12081298.
- Lammel, T., Sturve, J. (2018). Assessment of titanium dioxide nanoparticle toxicity in the rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) liver and gill cell lines RTL-W1 and RTgill-W1 under particular consideration of nanoparticle stability and interference with fluorometric assays. *NanoImpact* 11, 1–19. doi: 10.1016/j.impact.2018.01.001.

- Landrigan, P. J., Fuller, R. (2014). Environmental pollution and occupational health in a changing world. *Annals of Global Health*, Jul-Aug;80(4):245-6. doi: 10.1016/j.aogh.2014.09.004.
- Landrigan, P. J., Fuller, R. (2015). Global health and environmental pollution. *International Journal of Public Health*, Nov;60(7):761-2. doi: 10.1007/s00038-015-0706-7.
- Law, R. J., Herzke, D. (2010). Current Levels and Trends of Brominated Flame Retardants in the Environment. In: Eljarrat, E., Barceló, D. (Eds.). *En: Brominated Flame Retardants. The Handbook of Environmental Chemistry*, 16. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/698_2010_82.
- Lea, T. (2015). Caco-2 Cell Line. En: Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H. (Eds.). *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* [Internet]. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4_10.
- Lee, L. E., Clemons, J. H., Bechtel, D. G., Caldwell, S. J., Han, K. B., Pasitschniak-Arts, M., Mosser, D. D., Bols, N. C. (1993). Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. *Cell Biology and Toxicology*, Jul-Sep;9(3):279-94. doi: 10.1007/BF00755606.
- Lee, L. E. J., Dayeh, V. R., Schirmer, K., Bols, N. C. (2009). Applications and potential uses of fish gill cell lines: examples with RTgill-W1. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal*, 45, 127–34. doi: 10.1007/s11626-008-9173-2.
- Lee S. H. (2015). Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intestinal Research*, 13(1), 11–18. doi: 10.5217/ir.2015.13.1.11.
- Lei, L., Wu, S., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Fu, Z., Shi, H., Raley-Susman, K. M., He, D. (2018). Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Science of The Total Environment*, 619-620, 1–8. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.103.
- Leist, M., Ghallab, A., Graepel, R., Marchan, R., Hassan, R., Bennekou, S. H., Limonciel, A., Vinken, M., Schildknecht, S., Waldmann, T., Danen, E., van Ravenzwaay, B., Kamp, H., Gardner, I., Godoy, P., Bois, F. Y., Braeuning, A., Reif, R., Oesch, F., Drasdo, D., ... Hengstler, J. G. (2017). Adverse outcome pathways: opportunities, limitations and open questions. *Archives of Toxicology*, 91(11), 3477–3505. doi: 10.1007/s00204-017-2045-3.
- Leoni, B. D., Natoli, M., Nardella, M., Bucci, B., Zucco, F., D'Agnano, I., Felsani, A. (2012). Differentiation of Caco-2 cells requires both transcriptional and post-translational down-regulation of Myc. *Differentiation*, 83(3), 116–127. doi: 10.1016/j.diff.2011.10.005.
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., Zweibaum, A. (1990). Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Research*, 50(19), 6334–6343.
- Li, S., Ma, R., Zhu, X., Liu, C., Li, L., Yu, Z., Chen, X., Li, Z., Yang, Y. (2021). Sorption of tetrabromobisphenol A onto microplastics: Behavior, mechanisms, and the effects of sorbent and environmental factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 210, 111842. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111842.
- Lilienthal, H., Verwer, C.M., van der Ven, L.T., Piersma, A.H., Vos, J.G. (2008). Exposure to tetrabromobisphenol A (TBBPA) in Wistar rats: neurobehavioral effects in offspring from a one-generation reproduction study. *Toxicology*, 246(1), 45–54. doi: 10.1016/j.tox.2008.01.007.

- Lillini, R., Tittarelli, A., Bertoldi, M., Ritchie, D., Katalinic, A., Pritzkeleit, R., Launoy, G., Launay, L., Guillaume, E., Žagar, T., Modonesi, C., Meneghini, E., Amati, C., Di Salvo, F., Contiero, P., Borgini, A., Baili, P. (2021). Water and Soil Pollution: Ecological Environmental Study Methodologies Useful for Public Health Projects. A Literature Review. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 256, 179–214. doi: 10.1007/398_2020_58.
- Linkert, M., Rueden, C. T., Allan, C., Burel, J. M., Moore, W., Patterson, A., Loranger, B., Moore, J., Neves, C., Macdonald, D., Tarkowska, A., Sticco, C., Hill, E., Rossner, M., Eliceiri, K. W., Swedlow, J. R. (2010). Metadata matters: access to image data in the real world. *The Journal of Cell Biology*, 189(5), 777–782. doi: 10.1083/jcb.201004104.
- Liu, W., Hu, D., Huo, H., Zhang, W., Adiliaghdam, F., Morrison, S., Ramirez, J. M., Gul, S. S., Hamarneh, S. R., Hodin, R. A. (2016). Intestinal Alkaline Phosphatase Regulates Tight Junction Protein Levels. *Journal of the American College of Surgeons*, 222(6), 1009–1017. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2015.12.006.
- Liu, S., Wu, X., Gu, W., Yu, J., Wu, B. (2020). Influence of the digestive process on intestinal toxicity of polystyrene microplastics as determined by in vitro Caco-2 models. *Chemosphere*, 256, 127204. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127204.
- Liu, S., Junaid, M., Liao, H., Liu, X., Wu, Y., Wang, J. (2022). Eco-corona formation and associated ecotoxicological impacts of nanoplastics in the environment. *Science of The Total Environment*, 836. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155703.
- Luo, Y. S., Chen, Z., Hsieh, N. H., Lin, T. E. (2022). Chemical and biological assessments of environmental mixtures: A review of current trends, advances, and future perspectives. *Journal of Hazardous Materials*, 432, 128658. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.128658.
- Mahler, G. J., Shuler, M. L., Glahn, R. P. (2009). Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(7), 494–502. doi: 10.1016/j.jnutbio.2008.05.006.
- Mahler, G. J., Esch, M. B., Tako, E., Southard, T. L., Archer, S. D., Glahn, R. P., Shuler, M. L. (2012). Oral exposure to polystyrene nanoparticles affects iron absorption. *Nature Nanotechnology*, 7(4), 264–271. doi: 10.1038/nnano.2012.3.
- Margolin, Y., Cloutier, J. F., Shafirovich, V., Geacintov, N. E., Dedon, P. C. (2006). Paradoxical hotspots for guanine oxidation by a chemical mediator of inflammation. *Nature Chemical Biology*, 2(7), 365–366. doi: 10.1038/nchembio796.
- Markkanen, E. (2017). Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA damage. *DNA Repair*, 59, 82–105. doi: 10.1016/j.dnarep.2017.09.007.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I. (2015). Chapter 11 - HT29 Cell Line. En: Verhoeckx K., Cotter P., López-Expósito I., Kleiveland C., Lea T., Mackie A., Requena T., Swiatecka D., Wichers H., (Eds.). *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* [Internet]. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4_11.
- Materic, D., Peacock, M., Dean, J., Futter, M., Maximov, T., Moldan, F., Röckmann, T., Holzinger, R. (2022). Presence of nanoplastics in rural and remote surface waters. *Environmental Research Letters*. 17. doi: 10.1088/1748-9326/ac68f7.

- Mattsson, K., Johnson, E. V., Malmendal, A., Linse, S., Hansson, L. A., Cedervall, T. (2017). Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain. *Scientific Reports*, 7(1), 11452. doi: 10.1038/s41598-017-10813-0.
- McCormick, J. M., Paiva, M. S., Häggblom, M. M., Cooper, K. R., White, L. A. (2010). Embryonic exposure to tetrabromobisphenol A and its metabolites, bisphenol A and tetrabromobisphenol A dimethyl ether disrupts normal zebrafish (*Danio rerio*) development and matrix metalloproteinase expression. *Aquatic Toxicology* (Amsterdam, Netherlands), 100(3), 255–262. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.07.019.
- Meeker, J. D., Sathyanarayana, S., Swan, S. H. (2009). Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1526), 2097–2113. doi: 10.1098/rstb.2008.0268.
- Meerts, I. A., Letcher, R. J., Hoving, S., Marsh, G., Bergman, A., Lemmen, J. G., van der Burg, B., Brouwer, A. (2001). In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environmental Health Perspectives*, 109(4), 399–407. doi: 10.1289/ehp.01109399.
- Michaud, J. P., Gandolfi, A. J., Brendel, K. (1995). Methods of Assessing Toxic Interactions in Vitro: Experimental Design and Data Analysis. *Toxicology Methods*, 5(1), 21–40. doi:10.3109/15376519509066115.
- Minghetti, M., Drieschner, C., Bramaz, N., Schug, H., Schirmer, K. (2017). A fish intestinal epithelial barrier model established from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cell line, RTgutGC. *Cell Biology and Toxicology*, Dec;33(6):539-555. doi: 10.1007/s10565-017-9385-x.
- Mohana, A. A., Farhad, S. M., Haque, N., Pramanik, B. K. (2021). Understanding the fate of nano-plastics in wastewater treatment plants and their removal using membrane processes. *Chemosphere*, 284. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.131430.
- Monopoli, M., Åberg, C., Salvati, A., Dawson, K. A. (2012). Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*, 7, 779–786 (2012). doi: 10.1038/nnano.2012.207.
- Morris, S., Allchin, C. R., Zegers, B. N., Haftka, J. J., Boon, J. P., Belpaire, C., Leonards, P. E., Van Leeuwen, S. P., De Boer, J. (2004). Distribution and fate of HBCD and TBBPA brominated flame retardants in North Sea estuaries and aquatic food webs. *Environmental Science and Technology*, 38(21), 5497–5504. doi: 10.1021/es049640i.
- Mrakovcic, M., Absenger, M., Riedl, R., Smole, C., Roblegg, E., Fröhlich, L. F., Fröhlich, E. (2013). Assessment of long-term effects of nanoparticles in a microcarrier cell culture system. *PloS One*, 8(2), e56791. doi: 10.1371/journal.pone.0056791.
- Mukherjee, P. K. (2019). Chapter 13 - Bioassay-Guided Isolation and Evaluation of Herbal Drugs. En: *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs*. 515-537. doi: 10.1016/B978-0-12-813374-3.00013-2.
- Muruzabal, D., Collins, A., Azqueta, A. (2021). The enzyme-modified comet assay: Past, present and future. *Food and Chemical Toxicology*, 147, 111865. doi: 10.1016/j.fct.2020.111865.
- Nakagawa, Y., Suzuki, T., Ishii, H., Ogata, A. (2007). Biotransformation and cytotoxicity of a brominated flame retardant, tetrabromobisphenol A, and its analogues in rat hepatocytes. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 37(7), 693–708. doi: 10.1080/00498250701397697.

- Nakajima, A., Saigusa, D., Tetsu, N., Yamakuni, T., Tomioka, Y., Hishinuma, T. (2009). Neurobehavioral effects of tetrabromobisphenol A, a brominated flame retardant, in mice. *Toxicology Letters*, 189(1), 78–83. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.05.003.
- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) (2023). *Exposome and Exposomics*. National Institute for Occupational Safety and Health. Washington, DC. EE. UU. <https://www.cdc.gov/niosh/topics/exposome/default.html>. Consultado el 24 de abril de 2023.
- Natoli, M., Leoni, B. D., D'Agnano, I., D'Onofrio, M., Brandi, R., Arisi, I., Zucco, F., Felsani, A. (2011). Cell growing density affects the structural and functional properties of Caco-2 differentiated monolayer. *Journal of Cellular Physiology*, 226, 1531–1543.
- Nelms, S. E., Galloway, T. S., Godley, B. J., Jarvis, D. S., Lindeque, P. K. (2018). Investigating microplastic trophic transfer in marine top predators. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 238, 999–1007. doi: 10.1016/j.envpol.2018.02.016.
- Noren Hooten, N., Kompaniez, K., Barnes, J., Lohani, A., Evans, M. K. (2011). Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1). *The Journal of Biological Chemistry*, 286(52), 44679–44690. doi: 10.1074/jbc.M111.255869.
- NORMAN Network (2022). *Emerging Substances: NORMAN List of Emerging Substances*. <https://www.norman-network.net/?q=node/81>. Consultado el 15 de diciembre de 2022.
- Nos, D., Navarro, J., Saiz, E., Sanchez-Hernandez, J. C., Solé, M. (2020). Tetrabromobisphenol A inhibits carboxylesterase activity of marine organisms from different trophic levels. *Chemosphere*, 238, 124592. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.124592.
- Okeke, E. S., Huang, B., Mao, G., Chen, Y., Zhengjia, Z., Qian, X., Wu, X., Feng, W. (2022). Review of the environmental occurrence, analytical techniques, degradation and toxicity of TBBPA and its derivatives. *Environmental Research*, 206. doi: 10.1016/j.envres.2021.112594.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2021). En: *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Effects on Biotic Systems: Test No. 249: Fish Cell Line Acute Toxicity - The RTgill-W1 cell line assay*. Paris, France. doi: 10.1787/20745761.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2022a). *Chemical safety and biosafety: testing of chemicals. Adverse Outcome Pathways, Molecular Screening and Toxicogenomics*. Paris, France. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/adverse-outcome-pathways-molecular-screening-and-toxicogenomics.htm>. Consultado el 10 de noviembre de 2022.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2022b). *Chemical safety and biosafety: testing of chemicals. Omics technologies in chemical testing*. Paris, France. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/omics.htm>. Consultado el 20 de noviembre de 2022.
- Osimitz, T. G., Droege, W., Hayes, A. W. (2016). Subchronic toxicology of tetrabromobisphenol A in rats. *Human and Experimental Toxicology*, 35(11), 1214–1226. doi: 10.1177/0960327115627684.
- Ozawa, T., Takayama, K., Okamoto, R., Negoro, R., Sakurai, F., Tachibana, M., Kawabata, K., Mizuguchi, H. (2015). Generation of enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells for drug absorption and metabolism studies in human small intestine. *Scientific Reports*, 5, 16479. doi: 10.1038/srep16479.

- Pal, A., He, Y., Jekel, M., Reinhard, M., Gin, K. Y. (2014). Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. *Environment International*, 71, 46–62. doi: 10.1016/j.envint.2014.05.025.
- Pamies, D., Hartung, T. (2017). 21st Century Cell Culture for 21st Century Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, Jan 17;30(1):43-52. doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00269.
- Parsons, A., Lange, A., Hutchinson, T. H., Miyagawa, S., Iguchi, T., Kudoh, T., Tyler, C. R. (2019). Molecular mechanisms and tissue targets of brominated flame retardants, BDE-47 and TBBPA, in embryo-larval life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 209, 99–112. doi: 10.1016/j.aquatox.2019.01.022.
- Perini, D. A., Parra-Ortiz, E., Varó, I., Queralt-Martín, M., Malmsten, M., Alcaraz, A. (2022). Surface-Functionalized Polystyrene Nanoparticles Alter the Transmembrane Potential via Ion-Selective Pores Maintaining Global Bilayer Integrity. *Langmuir*, 38(48), 14837–14849. doi: 10.1021/acs.langmuir.2c02487.
- Perry, G. M., McDonald, G. J., Ferguson, M. M., Ganassin, R. C., Bols, N. C. (2001). Characterization of rainbow trout cell lines using microsatellite DNA profiling. *Cytotechnology*, Nov;37(3):143-51. doi: 10.1023/A:1020516804173.
- Philip Morris International (2022). PMI Science. Study Design Principles in Systems Toxicology. Laussane, Switzerland. <https://www.intervals.science/docs/default-source/default-document-library/study-design-principles-template-systox.pdf>. Consultado el 2 de diciembre de 2022.
- Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assman, P., Haffen, K., Fogh, J., Zweibaum, A. (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell*, 47:1323-330.
- Poetsch, A. R. (2020). The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 207–219. doi: 10.1016/j.csbj.2019.12.013.
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., Hübner, H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1601, 1–17. doi: 10.1007/978-1-4939-6960-9_1.
- Prata, J. C., da Costa, J. P., Lopes, I., Duarte, A. C., Rocha-Santos, T. (2020). Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *The Science of The Total Environment*, 702, 134455. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134455.
- Qiao, J., Chen, R., Wang, M., Bai, R., Cui, X., Liu, Y., Wu, C., Chen, C. (2021). Perturbation of gut microbiota plays an important role in micro/nanoplastics-induced gut barrier dysfunction. *Nanoscale*, 13(19). doi: 10.1039/d1nr00038a.
- Rahman, M. H., Bhoi, P. R. (2021). An overview of non-biodegradable bioplastics. *Journal of Cleaner Production*, 294. doi: 10.1016/j.jclepro.2021.126218.
- Rampersad S. N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12(9), 12347–12360. doi: 10.3390/s120912347.

- Reinholz, J., Diesler, C., Schöttler, S., Kokkinopoulou, M., Ritz, S., Landfester, K., Mailänder, V. (2018). Protein machineries defining pathways of nanocarrier exocytosis and transcytosis. *Acta Biomaterialia*, 71, 432–443. doi: 10.1016/j.actbio.2018.03.006.
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125–1131. doi: 10.1038/nprot.2008.75.
- Rhodes, C. J. (2018). Plastic pollution and potential solutions. *Science Progress*, 101(3), 207–260. doi: 10.3184/003685018X15294876706211.
- Richardson, S. D., Ternes, T. A. (2014). Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, 86(6), 2813–2848. doi: 10.1021/ac500508t.
- Rodriguez-Narvaez, O. M., Peralta-Hernandez, J. M., Goonetilleke, A., Bandala, E. R. (2017). Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. *Chemical Engineering Journal*, 323, 361–380. doi: 10.1016/j.cej.2017.04.106.
- Rosenfeld, P. E., Feng, L. G. H. (2011). Chapter 16 - Emerging Contaminants. En: Rosenfeld P. E., Feng L. G. H. (Eds.). *Risks of Hazardous Wastes*. William Andrew Publishing. 215–222. doi: 10.1016/B978-1-4377-7842-7.00016-7.
- Rossi, G., Manfrin, A., Lutolf, M. P. (2018). Progress and potential in organoid research. *Nature Reviews Genetics*, Nov;19(11):671–687. doi: 10.1038/s41576-018-0051-9.
- Rozman, K. K., Doull, J., Hayes, W. J. (2010). Chapter 1 - Dose and Time Determining, and Other Factors Influencing, Toxicity. En: Hayes' *Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)*. Academic Press. 3–101. Doi: 10.1016/B978-0-12-374367-1.00001-X.
- Russell, W. M. S., Burch, R. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. London, UK: Methuen.
- Santos, G. M., Ismael, S., Morais, J., Araújo, J. R., Faria, A., Calhau, C., Marques, C. (2022). Intestinal Alkaline Phosphatase: A Review of This Enzyme Role in the Intestinal Barrier Function. *Microorganisms*, 10(4), 746. doi: 10.3390/microorganisms10040746.
- Satoh, M. S., Poirier, G. G., Lindahl, T. (1994). Dual function for poly(ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage. *Biochemistry*, 33(23), 7099–7106. doi: 10.1021/bi00189a012.
- Schauer, U. M., Völkel, W., Dekant, W. (2006). Toxicokinetics of tetrabromobisphenol a in humans and rats after oral administration. *Toxicological Sciences*, 91(1), 49–58. doi: 10.1093/toxsci/kfj132.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T., Gey, G. O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *Journal of Experimental Medicine*, May;97(5):695–710. doi: 10.1084/jem.97.5.695.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019.

- Schirmer, K., Chan, A. G., Greenberg, B. M., Dixon, D. G., Bols, N. C. (1997). Methodology for demonstrating and measuring the photocytotoxicity of fluoranthene to fish cells in culture. *Toxicology in Vitro*, 11(1-2), 107–119. doi: 10.1016/s0887-2333(97)00002-7.
- Schraufnagel, D. E., Balmes, J. R., De Matteis, S., Hoffman, B., Kim, W. J., Perez-Padilla, R., Rice, M., Sood, A., Vanker, A., Wuebbles, D. J. (2019). Health Benefits of Air Pollution Reduction. *Annals of the American Thoracic Society*, Dec;16(12):1478-1487. doi: 10.1513/AnnalsATS.201907-538CME.
- Schreer, A., Tinson, C., Sherry, J. P., Schirmer, K. (2005). Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester as a noninvasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. *Analytical Biochemistry*, 344(1), 76–85. doi: 10.1016/j.ab.2005.06.009.
- Sellström, U., Jansson, B., Kierkegaard, A., de Wit, C., Odsjö, T., Olsson, M. (1993). Polybrominated diphenyl ethers (PBDE) in biological samples from the Swedish environment. *Chemosphere*, 26(9). 1703-1718. doi: 10.1016/0045-6535(93)90114-K.
- Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., Harding, I. (2014). Optimisation and stability assessment of solid lipid nanoparticles using particle size and zeta potential. *Journal of Physical Science*, 25, 59.
- Sharma, S., Chatterjee, S. (2017). Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 21530–21547. doi: 10.1007/s11356-017-9910-8.
- Shen, M., Cheng, J., Wu, R., Zhang, S., Mao, L., Gao, S. (2012). Metabolism of polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A by fish liver subcellular fractions in vitro. *Aquatic Toxicology*, 114–115, 73–9. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.02.010.
- Shen, M., Zhang, Y., Zhu, Y., Song, B., Zeng, G., Hu, D., Wen, X., Ren, X. (2019). Recent advances in toxicological research of nanoplastics in the environment: A review. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 252(Pt A), 511–521. doi: 10.1016/j.envpol.2019.05.102.
- Shi, Y., Ji, Y., Sun, H., Hui, F., Hu, J., Wu, Y., Fang, J., Lin, H., Wang, J., Duan, H., Lanza, M. (2015). Nanoscale characterization of PM 2.5 airborne pollutants reveals high adhesiveness and aggregation capability of soot particles. *Scientific Reports*, 5, 11232. doi: 10.1038/srep11232.
- Shin, J., Carr, A., Corner, G. A., Tögel, L., Dávalos-Salas, M., Tran, H., Chueh, A. C., Al-Obaidi, S., Chionh, F., Ahmed, N., Buchanan, D. D., Young, J. P., Malo, M. S., Hodin, R. A., Arango, D., Sieber, O. M., Augenlicht, L. H., Dhillon, A. S., Weber, T. K., Mariadason, J. M. (2014). The intestinal epithelial cell differentiation marker intestinal alkaline phosphatase (ALPi) is selectively induced by histone deacetylase inhibitors (HDACi) in colon cancer cells in a Kruppel-like factor 5 (KLF5)-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(36), 25306–25316. doi: 10.1074/jbc.M114.557546.
- Sivan, A. (2011). New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 422–426. doi: 10.1016/j.copbio.2011.01.013.
- Siziba, N., Sero, E. T. (2022). Pollutants of Emerging Concern in Urban-wastewater Impacted Aquatic Environments and Management Recommendations. Massarelli, C., Campanale C. (Eds.) En: *Limnology - The Importance of Monitoring and Correlations of Lentic and Lotic Waters [Working Title]*. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.106943.

- Sjödin, A., Hagmar, L., Klasson-Wehler, E., Kronholm-Diab, K., Jakobsson, E., Bergman, A. (1999). Flame retardant exposure: polybrominated diphenyl ethers in blood from Swedish workers. *Environmental Health Perspectives*, Aug;107(8):643-8. doi: 10.1289/ehp.107-1566483.
- Smith, J., Tho, L. M., Xu, N., Gillespie, D. A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in Cancer Research*, 108, 73–112. doi: 10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0.
- Smith, M. T. (2014). Exposome, The. Wexler, P. (Ed). En: *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. Academic Press, 576. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00087-7.
- Smith, M. L., Hostetler, C. M., Heinricher, M. M., Ryabinin, A. E. (2016). Social transfer of pain in mice. *Science Advances*, Oct 19;2(10): e1600855. doi: 10.1126/sciadv.1600855.
- Smyth, D. H. (1978). *Alternatives to Animal Experiments*. London (UK).
- Stadnicka-Michalak, J., Weiss, F. T., Fischer, M., Tanneberger, K., Schirmer, K. (2018). Biotransformation of benzo [a]pyrene by three rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) cell lines and extrapolation to derive a fish bioconcentration factor. *Environmental Science and Technology* 52, 3091–3100. doi: 10.1021/acs.est.7b04548.
- Stapleton, P. A. (2019). Toxicological considerations of nano-sized plastics. *AIMS Environmental Science*, 6(5), 367–378. doi: 10.3934/environsci.2019.5.367.
- Strack, S., Detzel, T., Wahl, M., Kuch, B., Krug, H. F. (2007). Cytotoxicity of TBBPA and effects on proliferation, cell cycle and MAPK pathways in mammalian cells. *Chemosphere*, 67(9), S405–S411. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.05.136.
- Sun, H., Shen, O. X., Wang, X. R., Zhou, L., Zhen, S. Q., Chen, X. D. (2009). Anti-thyroid hormone activity of bisphenol A, tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A in an improved reporter gene assay. *Toxicology in Vitro*, 23(5), 950–954. doi: 10.1016/j.tiv.2009.05.004.
- Suski, J., Lebiezinska, M., Bonora, M., Pinton, P., Duszynski, J., Wieckowski, M. R. (2018). Relation Between Mitochondrial Membrane Potential and ROS Formation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1782, 357–381. doi: 10.1007/978-1-4939-7831-1_22.
- Szychowski, K. A., Rybczyńska-Tkaczyk, K., Leja, M. L., Wójtowicz, A. K., Gmiński, J. (2016). Tetrabromobisphenol A (TBBPA)-stimulated reactive oxygen species (ROS) production in cell-free model using the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) assay-limitations of method. *Environmental Science and Pollution Research, Int* 23, 12246–52. doi: 10.1007/s11356-016-6450-6.
- Szymańska, J. A., Piotrowski, J. K., Frydrych, B. (2000). Hepatotoxicity of tetrabromobisphenol-A: effects of repeated dosage in rats. *Toxicology*, 142(2), 87–95. doi: 10.1016/s0300-483x(99)00108-0.
- Tada, Y., Fujitani, T., Yano, N., Takahashi, H., Yuzawa, K., Ando, H., Kubo, Y., Nagasawa, A., Ogata, A., Kamimura, H. (2006). Effects of tetrabromobisphenol A, brominated flame retardant, in ICR mice after prenatal and postnatal exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 44(8), 1408–1413. doi: 10.1016/j.fct.2006.03.006.
- Taghavi, N., Udugama, I. A., Zhuang, W. Q., Baroutian, S. (2021). Challenges in biodegradation of non-degradable thermoplastic waste: From environmental impact to operational readiness. *Biotechnology Advances*, 49, 107731. doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107731.

- Talbot, P., Radziwill-Bienkowska, J. M., Kamphuis, J. B. J., Steenkeste, K., Bettini, S., Robert, V., Noordine, M. L., Mayeur, C., Gaultier, E., Langella, P., Robbe-Masselot, C., Houdeau, E., Thomas, M., Mercier-Bonin, M. (2018). Food-grade TiO₂ is trapped by intestinal mucus in vitro but does not impair mucin O-glycosylation and short-chain fatty acid synthesis in vivo: implications for gut barrier protection. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 53. doi: 10.1186/s12951-018-0379-5.
- Taltec, K., Blard, O., González-Fernández, C., Brotons, G., Berchel, M., Soudant, P., Huvet, A., Paul-Pont, I. (2019). Surface functionalization determines behavior of nanoplastic solutions in model aquatic environments. *Chemosphere*, 225, 639–646. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.077.
- Tanneberger, K., Knöbel, M., Busser, F. J. M., Sinnige, T. L., Hermens, J. L. M., Schirmer, K. (2013). Predicting fish acute toxicity using a fish gill cell line-based toxicity assay. *Environmental Science and Technology*, 47, 1110–9. doi: 10.1021/es303505z.
- Teuten, E. L., Saquing, J. M., Knappe, D. R., 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., Akkavong, K., Ogata, Y., ... Takada, H. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1526), 2027–2045. doi: 10.1098/rstb.2008.0284.
- Thorpe, K. L., Hutchinson, T. H., Hetheridge, M. J., Scholze, M., Sumpter, J. P., Tyler, C. R. (2001). Assessing the Biological Potency of Binary Mixtures of Environmental Estrogens using Vitellogenin Induction in Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Science and Technology*, 35(12), 2476–2481. doi: 10.1021/es001767u.
- Toms, L. M. L., Hearn, L., Sjödin, A., Mueller, J. F. (2010). Human Exposure to Brominated Flame Retardants. Eljarrat, E., Barceló, D. (Eds.). En: *Brominated Flame Retardants. The Handbook of Environmental Chemistry*, vol 16. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/698_2010_90.
- Torres-Ruiz, M., De la Vieja, A., de Alba Gonzalez, M., Esteban Lopez, M., Castaño Calvo, A., Cañas Portilla, A. I. (2021). Toxicity of nanoplastics for zebrafish embryos, what we know and where to go next. *The Science of The Total Environment*, 797, 149125. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149125.
- Turner, J. R. (2006). Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *The American Journal of Pathology*, 169(6), 1901–1909. doi: 10.2353/ajpath.2006.060681.
- Tyson, C. A., Frazier, J. M. (1993). *In vitro biological systems: methods in toxicology*. Academic Press.
- Van Asperen, J., Van Tellingen, O., Beijnen, J. H. (1998). The pharmacological role of P-glycoprotein in the intestinal epithelium. *Pharmacological Research*, 37(6), 429–435. doi: 10.1006/phrs.1998.0326.
- Van der Ven, L. T., Van de Kuil, T., Verhoef, A., Verwer, C. M., Lilienthal, H., Leonards, P. E., Schauer, U. M., Cantón, R. F., Litens, S., De Jong, F. H., Visser, T. J., Dekant, W., Stern, N., Håkansson, H., Slob, W., Van den Berg, M., Vos, J. G., Piersma, A. H. (2008). Endocrine effects of tetrabromobisphenol-A (TBBPA) in Wistar rats as tested in a one-generation reproduction study and a subacute toxicity study. *Toxicology*, 245(1-2), 76–89. doi: 10.1016/j.tox.2007.12.009.
- Vanparys, P., Corvi, R., Aardema, M., Gribaldo, L., Hayashi, M., Hoffmann, S., Schechtman, L. (2011). ECVAM prevalidation of three cell transformation assays. *ALTEX*. 28(1):56-9. doi: 10.14573/altex.2011.1.056.

- Ventriglio, A., Bellomo, A., di Gioia, I., Di Sabatino, D., Favale, D., De Berardis, D., Cianconi, P. (2021). Environmental pollution and mental health: a narrative review of literature. *CNS Spectrums*, Feb;26(1):51-61. doi: 10.1017/S1092852920001303.
- Vitali, C., Peters, R., Janssen, H. G., Nielen, M. W. F. (2022). Microplastics and nanoplastics in food, water, and beverages; part I. Occurrence. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. doi: 10.1016/j.trac.2022.116670.
- Vousden, K. H., Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews. Cancer*, 2(8), 594–604. doi: 10.1038/nrc864.
- Waaaijers, S. L., Parsons, J. R. (2016). Biodegradation of brominated and organophosphorus flame retardants. *Current Opinion in Biotechnology*, 38. 14-23. doi: 10.1016/j.copbio.2015.12.005.
- Walczak, A. P., Hendriksen, P. J., Woutersen, R. A., van der Zande, M., Undas, A. K., Helsdingen, R., van den Berg, H. H., Rietjens, I. M., Bouwmeester, H. (2015). Bioavailability and biodistribution of differently charged polystyrene nanoparticles upon oral exposure in rats. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(5), 231. doi: 10.1007/s11051-015-3029-y.
- Wallberg, F., Tenev, T., Meier, P. (2016). Analysis of Apoptosis and Necroptosis by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4):pdb.prot087387.
- Walum, E., Clemedson, C., Ekwall, B. (1994). Principles for the validation of in vitro toxicology test methods, 8(4), 807–812. doi:10.1016/0887-2333(94)90073-6.
- Wang, F., Yu, L., Monopoli, M. P., Sandin, P., Mahon, E., Salvati, A., Dawson, K. A. (2013). The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9(8), 1159–1168. doi: 10.1016/j.nano.2013.04.010.
- Wang, Q., Chuikov, S., Taitano, S., Wu, Q., Rastogi, A., Tuck, S. J., Corey, J. M., Lundy, S. K., Mao-Draayer, Y. (2015). Dimethyl Fumarate Protects Neural Stem/Progenitor Cells and Neurons from Oxidative Damage through Nrf2-ERK1/2 MAPK Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 13885–13907. doi: 10.3390/ijms160613885.
- Wang, F., Salvati, A., Boya, P. (2018). Lysosome-dependent cell death and deregulated autophagy induced by amine-modified polystyrene nanoparticles. *Open Biology*, 8(4), 170271. doi: 10.1098/rsob.170271.
- Watanabe, I., Kashimoto, T., Tatsukawa, R. (1983). Identification of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in the river sediment and the mussel collected in Osaka. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 31(1), 48–52. doi: 10.1007/BF01608765.
- Watanabe, I., Sakai, S. (2003). Environmental release and behavior of brominated flame retardants. *Environment International*, 29(6), 665-682. doi: 10.1016/S0160-4120(03)00123-5.
- Watanabe, W., Shimizu, T., Sawamura, R., Hino, A., Konno, K., Hirose, A., Kurokawa, M. (2010). Effects of tetrabromobisphenol A, a brominated flame retardant, on the immune response to respiratory syncytial virus infection in mice. *International Immunopharmacology*, 10(4), 393–397. doi: 10.1016/j.intimp.2009.12.014.
- Wei, G., Zhao, H., Huang, D., Hou, M. (2018). Degradation of tetrabromobisphenol A in a paddy soil during sequential anoxic-oxic incubation: Kinetics, metabolites, and potential pathways. *Scientific Reports*, 8(1), 13435. doi: 10.1038/s41598-018-31723-9.

- Wild C. P. (2005). Complementing the genome with an "exposome": the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 14(8), 1847–1850. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0456.
- Włuka, A., Woźniak, A., Woźniak, E., Michałowicz, J. (2020). Tetrabromobisphenol A, terabromobisphenol S and other bromophenolic flame retardants cause cytotoxic effects and induce oxidative stress in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Chemosphere*, 261, 127705. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127705.
- World Health Organization (WHO) (2022a). Data on the size of the HIV/AIDS epidemic: People dying from HIV-related causes. Global Health Observatory Data Repository. Geneva, Switzerland. <https://apps.who.int/gho/data/node.main.623?lang=en>. Consultado el 27 de octubre 2022.
- World Health Organization (WHO) (2022b). Malaria deaths: Estimated malaria deaths. Global Health Observatory Data Repository. Geneva, Switzerland. <https://apps.who.int/gho/data/view.main.MALARIAESTDEATHSvr?lang=en>. Consultado el 27 de octubre 2022.
- World Health Organization (WHO) (2022c). Tuberculosis cases and deaths: Mortality. Global Health Observatory Data Repository. Geneva, Switzerland. <https://apps.who.int/gho/data/view.main.57016ALL?lang=en>. Consultado el 27 de octubre 2022.
- Wu, S., Ji, G., Liu, J., Zhang, S., Gong, Y., Shi, L. (2016). TBBPA induces developmental toxicity, oxidative stress, and apoptosis in embryos and zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, 31(10), 1241–1249. doi: 10.1002/tox.22131.
- Wu, S., Wu, M., Qi, M., Zhong, L., Qiu, L. (2018). Effects of novel brominated flame retardant TBBPA on human airway epithelial cell (A549) in vitro and proteome profiling. *Environmental Toxicology*, 33(12), 1245–1253. doi: 10.1002/tox.22632.
- Wu, B., Wu, X., Liu, S., Wang, Z., Chen, L. (2019). Size-dependent effects of polystyrene microplastics on cytotoxicity and efflux pump inhibition in human Caco-2 cells. *Chemosphere*, 221, 333–341. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.056.
- Yan, L., Yu, Z., Lin, P., Qiu, S., He, L., Wu, Z., Ma, L., Gu, Y., He, L., Dai, Z., Zhou, C., Hong, P., Li, C. (2023). Polystyrene nanoplastics promote the apoptosis in Caco-2 cells induced by okadaic acid more than microplastics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 249, 114375. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114375.
- Yang, J., Chan, K. M. (2015). Evaluation of the toxic effects of brominated compounds (BDE-47, 99, 209, TBBPA) and bisphenol A (BPA) using a zebrafish liver cell line, ZFL. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 159, 138–147. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.12.011.
- Yang, H., Ma, M., Thompson, J. R., Flower, R. J. (2018). Waste management, informal recycling, environmental pollution and public health. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 72(3), 237–243. doi: 10.1136/jech-2016-208597.
- Yang, S., Cheng, Y., Chen, Z., Liu, T., Yin, L., Pu, Y., Liang, G. (2021). In vitro evaluation of nanoplastics using human lung epithelial cells, microarray analysis and co-culture model. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 226, 112837. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112837.

- Yong, C. Q. Y., Valiyaveetil, S., Tang, B. L. (2020). Toxicity of Microplastics and Nanoplastics in Mammalian Systems. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(5), 1509. doi: 10.3390/ijerph17051509.
- Yu, Y., Hou, Y., Dang, Y., Zhu, X., Li, Z., Chen, H., Xiang, M., Li, Z., Hu, G. (2021). Exposure of adult zebrafish (*Danio rerio*) to Tetrabromobisphenol A causes neurotoxicity in larval offspring, an adverse transgenerational effect. *Journal of Hazardous Materials*, 414, 125408. doi: 0.1016/j.jhazmat.2021.125408.
- Yuan, H., Chen, C. Y., Chai, G. H., Du, Y. Z., Hu, F. Q. (2013). Improved transport and absorption through gastrointestinal tract by PEGylated solid lipid nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, May 6;10(5):1865-73. doi: 10.1021/mp300649z.
- Yue, Y., Behra, R., Sigg, L., Fernández Freire, P., Pillai, S., Schirmer, K. (2015). Toxicity of silver nanoparticles to a fish gill cell line: role of medium composition. *Nanotoxicology*, 9, 54–63. doi: 10.3109/17435390.2014.889236.
- Zaki, M. R. M., Aris, A. Z. (2022). An overview of the effects of nanoplastics on marine organisms. *The Science of The Total Environment*, 831, 154757. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.154757.
- Zhang, D. D., Hannink, M. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Molecular and Cellular Biology*, 23(22), 8137–8151. doi: 10.1128/MCB.23.22.8137-8151.2003.
- Zhang, C., Zhao, Z., Abdul Rahim, N. A., van Noort, D., Yu, H. (2009). Towards a human-on-chip: culturing multiple cell types on a chip with compartmentalized microenvironments. *Lab on a Chip*, Nov 21;9(22):3185-92. doi: 10.1039/b915147h.
- Zhang, Z., Guan, N., Li, T., Mais, D. E., Wang, M. (2012). Quality control of cell-based high-throughput drug screening. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(5): 429-438. doi: 10.1016/j.apsb.2012.03.006.
- Zhang, Y., Wang, X., Chen, C., An, J., Shang, Y., Li, H., Xia, H., Yu, J., Wang, C., Liu, Y., Guo, S. (2019). Regulation of TBBPA-induced oxidative stress on mitochondrial apoptosis in L02 cells through the Nrf2 signaling pathway. *Chemosphere*, 226, 463–471. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.167.
- Zhao, K., Zhang, Y., Liu, M., Huang, Y., Wang, S., An, J., Wang, Y., Shang, Y. (2023). The joint effects of nanoplastics and TBBPA on neurodevelopmental toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology Research*, 12(1), 76–85. doi: 10.1093/toxres/tfac086.
- Zheng, J., Luo, X. J., Yuan, J. G., Wang, J., Wang, Y. T., Chen, S. J., Mai, B. X., Yang, Z. Y. (2011). Levels and sources of brominated flame retardants in human hair from urban, e-waste, and rural areas in South China. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 159(12), 3706–3713. doi: 10.1016/j.envpol.2011.07.009.
- Zheng, Q., Cui, L., Liao, H., Junaid, M., Li, Z., Liu, S., Gao, D., Zheng, Y., Lu, S., Qiu, J., Wang, J. (2023). Combined exposure to polystyrene nanoplastics and bisphenol A induces hepato- and intestinal-toxicity and disturbs gut microbiota in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *The Science of The Total Environment*, 891, 164319. Advance online publication. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.164319.
- Zhou, H., Yin, N., Faiola, F. (2020). Tetrabromobisphenol A (TBBPA): A controversial environmental pollutant. *Journal of Environmental Sciences*, 97, 54-66. doi: 10.1016/j.jes.2020.04.039.



ANEXO



PUBLICACIONES

Soto-Bielicka, P., Tejeda, I., Peropadre, A., Hazen, M. J., Fernández Freire, P. (2023). Detrimental effects of individual versus combined exposure to tetrabromobisphenol A and polystyrene nanoplastics in fish cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 98, 104072. doi: 10.1016/j.etap.2023.104072.

Soto-Bielicka, P., Peropadre, A., Sanz-Alfárez, S., Hazen, M. J., Fernández Freire, P. Influence of polystyrene nanoparticles on the toxicity of tetrabromobisphenol A on human intestinal Caco-2 cells. Finalizando escritura del manuscrito. Fecha prevista de envío a la revista "Cell Biology and Toxicology", julio 2023.

Soto-Bielicka, P., Peropadre, A., Sanz-Alfárez, S., Hazen, M. J., Fernández Freire, P. Toxicological evaluation of differentiated human Caco-2 cells exposed to tetrabromobisphenol A and polystyrene nanoparticles individually and in combination. En preparación: se está finalizando la organización de resultados para el manuscrito.