

ESTUDIO MICROSCÓPICO DE LOS EFECTOS SUBLETALES DE LOS NANOCOMPUESTOS DE BASE NIQUEL-ALUMINA SOBRE EMBRIONES Y LARVAS DE *RHINELLA ARENARUM*

Gabriela Svartz (1), Marina Gosatti (2), Maria Teresa Sandoval (3), Cristina Pérez Coll (1), Soledad Perez Catán(4).

- (1) Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental (3iA), Universidad de San Martín, Buenos Aires, Argentina. (2) Centro Atómico Bariloche-Complejo Tecnológico Pilcaniyeu-CNEA, Bariloche, Argentina, (3) Laboratorio de Herpetología. FACENA. Universidad Nacional del Noreste, Corrientes, Argentina.
(4) LAAN, Centro Atómico Bariloche-CNEA, Bariloche, Argentina.
Email: soleperezcatan@hotmail.com; marina.gosatti@cab.cnea.gov.ar

Es bien sabido que los nanomateriales (NMs) pueden poseer propiedades muy diferentes respecto al material a granel. Por lo tanto, es posible que materiales inocuos en su forma macroscópica, presenten a escala nanométrica, efectos tóxicos sobre los organismos vivos. Los NMs pueden tener mayor efecto tóxico debido a su tamaño reducido y elevada área superficial [1]. Las aplicaciones de los NMs han ido en aumento durante los últimos años, surgiendo la necesidad de evaluar su impacto tanto en el ambiente como en la salud. Las propiedades superficiales así como las propiedades químicas determinan la interacción del material con los sistemas biológicos, pudiendo inducir estrés oxidativo y disfunción celular, entre otros efectos. Los NMs de base γ -alúmina son ampliamente utilizados como soporte en catálisis heterogénea, debido a su estabilidad térmica y su alta área específica. Los catalizadores de Níquel/ γ -alúmina (NC) presentan especial interés ya que el proceso de hidrogenación catalítica que media es de importancia científico-tecnológica para numerosas industrias. Los anfibios son frecuentemente utilizados en evaluaciones toxicológicas debido a su elevada sensibilidad al estrés fisicoquímico, convirtiéndose en excelentes indicadores de contaminación acuática, por ejemplo mediante la aplicación de bioensayos con embriones y larvas de *Rhinella arenarum* (sapo común americano) que han sido ampliamente usados en nuestro país [2]. Frente a este escenario, se planteó como objetivo de este trabajo, estudiar los efectos subletales de dos NMs: el precursor de un catalizador nanocerámico de base gamma alúmina (PNC) y el catalizador de Ni/gamma alúmina (NC) sobre embriones y larvas de *R. arenarum*; a nivel macroscópico por Microscopía Estereoscópica (ME), histológico por Microscopía Óptica (MO) y celular por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y de Barrido (MEB) utilizando un detector de electrones retrodispersados. Los embriones de *R. arenarum* se obtuvieron mediante fertilización *in vitro* de oocitos con un macerado testicular, y se realizaron los bioensayos estandarizados ANFITOX [2], exponiendo en forma continua, grupos de 10 embriones/larvas por triplicado. Los periodos de exposición fueron: agudo (96h), crónico-corto (168h) y crónico (504h) a partir de blástula temprana (E4) y larvas en estadio de opérculo completo (E25), a concentraciones subletales comprendidas entre 0,0005 y 10 mg/L del PNC y del NC. Los resultados mostraron severos efectos subletales en embriones y larvas de *R. arenarum* por exposición tanto al PNC como al NC, que fueron concentración- y tiempo-dependientes. Dichos efectos a nivel macroscópico consistieron en: subdesarrollo general, microcefalia, hidropesía, ondulaciones en la aleta, incurvación total del embrión, subdesarrollo de branquias y diferentes grados de disociación celular (fig. 1-1 y 1-2), así como también alteraciones en el comportamiento. El NC resultó hasta 10 veces más tóxico para embriones y larvas que el PNC, obteniendo un valor NOEC (del inglés: No Observed Effect Concentration) de 5,02 mg/L, mientras que el mismo parámetro para el NC fue de 0,5 mg/L. Las observaciones al MO y MET de los embriones expuestos a los NMs, indicaron alteraciones en todos los tejidos analizados. Los embriones expuestos a 10 mg/L NC exhibieron desorganización tisular, disociación y desprendimiento de células epiteliales y células apoptóticas en los epitelios intestinal y bucofaríngeo, hígado y vasos sanguíneos. En el intestino, la altura del epitelio de revestimiento fue mayor en los embriones expuestos obliterando la luz del mismo, en comparación con los controles (fig. 1-3 y 1-4). Las imágenes obtenidas por MET revelaron gran cantidad de vacuolas lipídicas y hialinas, estas últimas correspondientes a lisosomas, posiblemente relacionadas con un proceso de autofagia celular, sugiriendo que el NM podría ser digerido por este proceso (fig. 2-2). En las imágenes del epitelio

4° Congreso de la Asociación Argentina de Microscopía (SAMIC 2016)

intestinal de embriones expuestos al NC tomadas con MEB, se observó un puntillado brillante sobre ciertas organelas que podrían corresponder al Ni del NC (fig. 2-4) a diferencia del control (fig. 2-3) donde dichos puntos no mostraron la misma intensidad. Las observaciones a través de las diferentes técnicas de microscopía evidencian que el material nanoparticulado podría ser el causante de la toxicidad, interfiriendo con funciones vitales como la respiración y digestión del alimento. La mayor toxicidad del NC podría estar asociada a la presencia de Ni. La continuación de los estudios realizando observaciones con diversas técnicas microscópicas permitirá registrar mayores evidencias respecto al sitio celular de deposición de los NC e intentar dilucidar el mecanismo acción toxicológico de los NMs.

REFERENCIAS

- [1] Perez Catan S., Svartz G., Papa M., Samter P., Jordán M., Peter Gauna R., Troiani H., Guraya M.M., Perez Coll C., (2015) “Environmental risk assessment of Alumina based nanomaterials, Ecotoxicity and Biodegradability study”. SETAC Europe 25th Annual Meeting pp 556.
- [2] Herkovits J., PerezColl C.S., (2001) “Bioensayos para test de toxicidad con embriones de anfibios (“AMPHITOX”)” *Ingenieria Sanitaria y Ambiental* 42:24-30.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Servicio Nacional de Microscopía Electrónica de La Plata por el servicio de MET; al Laboratorio de Microscopía del Grupo de Caracterización de Materiales del CAB-CNEA, por el servicio de MEB; y al Instituto Massone Argentina por la donación de HCG. Este trabajo ha sido parcialmente subvencionado por el MINCYT-PICT 0245-2013.

FIGURAS

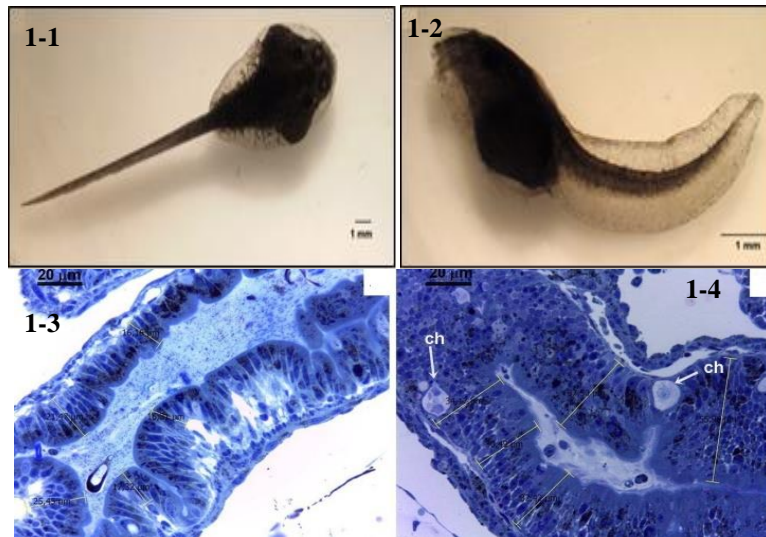


Figura 1. Imágenes de larvas de *R. arenarum* fijadas a las 168h obtenidas por ME: (1-1) larva control; (1-2) larva expuesta a 5 mg/L NC. Las imágenes de MO (1-3 y 1-4) corresponden a epitelio intestinal de embriones fijados a las 216h control y 10 mg/L NC respectivamente. ch: célula hipertrófica.

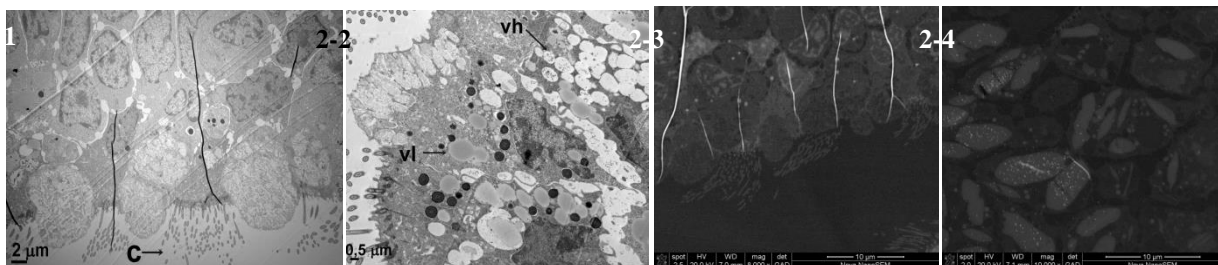


Figura 2. Imágenes del epitelio bucofaríngeo de embriones fijados a las 216h obtenidas por MET (2-1 y 2-2), y del epitelio intestinal por MEB con detector de electrones retrodispersados (2-3 y 2-4); (2-1 y 2-3) muestras control; (2-2 y 2-4) muestras expuestas a 10 mg NC/L. c: cilias, vl: vacuolas lipídicas, vh: vacuolas hialinas.