

Trabajo Fin de Grado
Grado en Biología

DetECCIÓN DE MICROPLÁSTICOS EN EL MEJILLÓN *Mytilus galloprovincialis* UTILIZANDO TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

Egilea/Autor/a:

Leire Aparicio Fernández

Zuzendaria/Director/a:

Urtzi Izagirre Aramaiona, Beñat Zaldibar Aramburu

© 2016 Leire Aparicio Fernández

ÍNDICE

1. Abstract	3
2. Introducción	4
3. Materiales y métodos	6
3.1. Recogida de las muestras	6
3.2. Exposición a microplásticos y tratamiento de tejidos	7
3.3. Procesamiento de las muestras	8
3.3.1. Procesamiento muestras fijadas	8
3.3.2. Procesamiento muestras congeladas	10
3.3.2.1. Azul de Toluidina	10
3.3.2.2. Lipofuscinas de Schmorl	10
3.3.2.3. Oil Red O (ORO).....	10
3.4. Observación de las muestras y tratamiento estadístico	10
3.4.1. Muestras fijadas.....	10
3.4.2. Muestras congeladas	11
4. Resultados	12
4.1. Detección de microplásticos.....	12
4.2. Distribución de microplásticos en los tejidos.....	13
4.3. Estudio de los efecto de los microplásticos.....	15
5. Discusión.....	19
5.1. Detección de los microplásticos	19
5.2. Distribución de los microplásticos en los tejidos	20
5.3. Estudio de los efectos de los microplásticos	21
5.3.1. Ratio CTD	21
5.3.2. Lipofuscinas y lípidos neutros.....	22
6. Conclusión.....	24
7. Bibliografía.....	24

1. Abstract

Plastic production has increased considerably in recent years, leading to an increase in the concentration of microplastics in the sea. In this study, the detection methods, distribution and effects in *Mytilus galloprovincialis* of two microplastics, polystyrene and polymethylmethacrylate (PMMA), have been studied. Mussels were exposed during 72 hours to microplastics, and after ingestion, they were detected and studied under microscope with different histological techniques. Fixed and frozen samples of gonads, gills and digestive gland were observed microscopically with brightfield and darkfield illumination. It was determined that the best way to detect microplastics was the use of frozen samples; although the selection of the stains used for this purpose will depend on the microplastic being studied. On the other hand, the time for microplastic ingestion was smaller than those described in other studies. The distribution is not dependent on the microplastic type; but the size is the major limiting factor. The biomarkers that were used (connective to digestive diverticula ratio and histochemical techniques) showed, in general, that microplastics produced negative effects in the digestive gland. The present study is useful to optimize microplastic detection methods, to determine their distribution, and to identify target tissues or cells and effects in organisms. Furthermore, this study provides proof of the differences in the effects in organisms depending on the type of microplastics.

La producción de plásticos ha aumentado considerablemente en los últimos años, dando lugar a un aumento de la concentración de microplásticos en el mar. En este trabajo se han estudiado los métodos de detección, distribución y efectos producidos en *Mytilus galloprovincialis* por dos tipos de microplásticos, poliestireno y polimetilmetacrilato (PMMA). Los mejillones fueron expuestos durante 72 horas a los microplásticos para que fuesen ingeridos y posteriormente detectados y estudiados mediante técnicas histológicas. Las muestras fijadas y congeladas de las gónadas, branquias y la glándula digestiva se observaron mediante microscopía óptica de campo claro y de campo oscuro. Se ha determinado que la observación de las muestras congeladas es la más adecuada para detectar microplásticos, aunque las tinciones empleadas para ello dependerán del tipo de microplástico que se esté estudiando. Por otro lado, se observó que los tiempos de ingestión de microplásticos son menores que los descritos hasta el momento y que la distribución de los microplásticos es dependiente de su tamaño. Los biomarcadores empleados (ratio del tejido conectivo respecto a divertículos digestivos y técnicas histoquímicas) indicaron, en general, que los microplásticos producen efectos negativos en la digestión. Este trabajo sirve para optimizar métodos de detección de microplásticos para determinar su distribución, tejidos y células diana y efectos en los organismos. Además, aporta evidencias de que cada tipo de microplástico afecta de manera distinta a los organismos.

2. Introducción

A lo largo del siglo XX la utilización de plásticos ha ido en aumento, lo que ha dado lugar a un incremento de su producción de manera considerable desde 1960 hasta 2014, pasando de producir 0,5 a 311 millones de toneladas al año (PlasticsEurope, 2015). Se estima que un 10% de esta producción termina en el mar (Thompson, 2006), por lo tanto la concentración de plásticos que hay en este medio es cada vez mayor. La concentración de plásticos en el mar sigue siendo desconocida, pero a partir de las mediciones realizadas en diferentes lugares se ha estimado que hoy en día por cada m² de costa habría aproximadamente 1,3 plásticos, sin especificar ni el tipo ni el tamaño de los mismos (GESAMP, 2010).

Actualmente, se conocen aproximadamente 200 familias de plásticos, que incluyen: polietileno, polipropileno, poliuretano, etc. (GESAMP, 2010). De acuerdo a Eriksen *et al.* (2014), los plásticos pueden clasificarse en función de su tamaño en: macro- (>200 mm de diámetro), meso- (~5 – 200 mm) o microplásticos (0,33 - ~5 mm). Aunque esta clasificación es muy variable dependiendo de los autores, la mayoría coinciden en que los microplásticos son aquellos plásticos de un diámetro menor a 5 mm (Andrady, 2011). Estudios realizados por Eriksen *et al.* (2014), muestran que los plásticos más abundantes en el mar en relación a su masa son los macroplásticos, que suponen a un 75,4% de los plásticos totales; el 11,4% y 13,2% corresponde a mesoplásticos y microplásticos, respectivamente.

Es bien sabido que los macroplásticos que aparecen en el mar son dañinos e incluso mortales para los vertebrados que lo habitan (peces, tortugas, aves marinas o mamíferos marinos) ya que, pueden enredarse con ellos o ser ingeridos poniendo en peligro su vida (Derraik, 2002; GESAMP, 2010). Durante décadas, la preocupación se centraba en la presencia de macroplásticos. Sin embargo, hoy en día los estudios sobre los microplásticos están en auge, por las implicaciones ecológicas que parecen tener (GESAMP, 2010). Los microplásticos que aparecen en los ambientes marinos pueden tener diversos orígenes: provenientes de la escorrentía, desgaste de macro- o mesoplásticos, o directamente de la industria, navíos o de algunos productos cosméticos, como pueden ser los exfoliantes (Andrady, 2011).

Numerosos estudios se han centrado en el efecto de los microplásticos en diversos organismos marinos: crustáceos, vertebrados, moluscos, etc. (Cole *et al.*, 2011). Muchos de estos estudios se han realizado en organismos del género *Mytilus* (Browne *et al.*, 2008; Von Moos *et al.*, 2012; Avio *et al.*, 2015). Estos organismos son de gran interés en el estudio de la contaminación, ya que se trata de invertebrados sedentarios que se alimentan por filtración, acumulando todos los contaminantes que hay en el medio que habitan (Bayne, 1976), incluyendo microplásticos. Cuando los organismos son expuestos a contaminantes se producen alteraciones en las branquias, gónadas y en la glándula digestiva (Zorita *et al.*, 2006; Garmendia *et al.*, 2011; Yavaşoğlu *et al.*, 2016). La glándula digestiva es

uno de los denominados órganos diana para los contaminantes, en la que pueden causar un aumento de la cantidad de peroxisomas y actividad de enzimas antioxidantes, cambios en la composición celular del epitelio, desestabilización de la membrana lisosómica en las células digestivas, acumulación lipídica intracelular, etc. (Brooks *et al.*, 2011).

Por esa razón, entender el proceso de alimentación y digestión de los mejillones puede ser de gran importancia para el estudio de los microplásticos. Este proceso comienza con el filtrado de las partículas de alimento por acción de las branquias. A continuación, las partículas se dirigen hacia los palpos labiales, facilitando su entrada en la boca y dirigiéndolas al esófago hasta llegar al estómago, donde ocurre la digestión extracelular. Los tractos ciliados presentes en el estómago ordenan las partículas de comida dirigiéndolas a la glándula digestiva o al intestino. (Bayne, 1976; Gosling, 2004).

La glándula digestiva se compone de conductos primarios, secundarios y alveolos. Los alveolos presentan dos tipos de células que se encargan de la digestión intra- y extracelular; las células digestivas y basófilas, respectivamente. Las células digestivas recogen el alimento y lo incorporan, realizando la digestión intracelular en lisosomas. Este podría ser el destino final de los microplásticos cuando son ingeridos, posiblemente causando efectos en la digestión de los mejillones. Los materiales de desecho de la glándula digestiva llegan hasta el intestino, donde se formarán los desechos y serán excretados al exterior (Gosling, 2004).

El estudio de la ingestión y acumulación de los microplásticos es de gran importancia, ya que estos procesos pueden llevar a un problema ecológico importante. Los microplásticos pueden causar daños a nivel de individuo y población, tales como, obstrucciones en todo el sistema digestivo, una reducción de la capacidad reproductiva o un coste energético mayor relacionado con la digestión (GESAMP, 2010; Wright *et al.*, 2013). Asimismo, los organismos de los primeros niveles de la cadena trófica que ingieren y acumulan microplásticos pueden causar daños a otros organismos, pues facilitan la entrada de microplásticos en la red alimenticia (Wright *et al.*, 2013). Así, los microplásticos podrían llegar a acumularse en grandes cantidades en los organismos o comunidades biológicas de los niveles tróficos superiores (Figueruelo & Dávila, 2004).

Otro aspecto a considerar es que se ha descrito cierta capacidad de adsorción de otros contaminantes por parte de los microplásticos (Andrady, 2011; Bouwmeester *et al.*, 2015). Estos contaminantes pueden ser fácilmente ingeridos por organismos marinos junto con los microplásticos, lo que facilita la transferencia de toxinas y contaminantes a diferentes niveles tróficos (GESAMP, 2010; Andrady, 2011). Por lo tanto, los organismos de los niveles tróficos más bajos representan una vía por la cual los microplásticos y sus contaminantes asociados pueden ser incorporados por otros organismos (Wright *et al.*, 2013), pudiendo afectar al funcionamiento del ecosistema marino y a las cadenas tróficas (Andrady, 2011). Por ello, para interpretar qué implicaciones ambientales pueden

tener los microplásticos y sus contaminantes asociados es importante conocer sus vías de entrada y acumulación.

Los microplásticos presentan una gran variedad de formas, tamaños y composición (Cole *et al.*, 2011). Actualmente no existe un método estandarizado para la detección de microplásticos, sin embargo, existen diversas técnicas de detección para muestras marinas, de sedimentos y de la biota (Löder & Gerdts, 2015). Muchos de estos se basan en la fragmentación de la muestra, sea cual sea su origen (Löder & Gerdts, 2015), su aislamiento y posterior identificación y clasificación (Hartl, 2015). Para poder identificar y clasificar los microplásticos se emplean principalmente dos métodos espectroscópicos: espectrofotometría de infrarrojos de transformada de Fourier (FT-IR) y espectroscopia de Raman (Bouwmeester *et al.*, 2015; Hartl, 2015; Löder & Gerdts, 2015). Sin embargo, los métodos más empleados al ser destructivos (al menos parcialmente) no permiten relacionar directamente los mecanismos de acción y las células diana de los microplásticos, y por lo tanto, no nos da información del estado de salud del organismo. Por esa razón, se están comenzando a emplear métodos alternativos que permiten observar los microplásticos directamente en los organismos. Para ello, se han desarrollado técnicas de observación a microscopio que incluyen muestras cortadas a criostato observadas con luz polarizada, iluminación de campo claro y microscopía de fluorescencia (Browne *et al.*, 2008; Von Moos *et al.*, 2012; Avio *et al.*, 2015).

Hasta el momento, los estudios han mostrado una ingestión de microplásticos y una acumulación, sobre todo, en la glándula digestiva. Asimismo, se han observado efectos negativos que estos pueden producir en los organismos (Browne *et al.*, 2008; Von Moos *et al.*, 2012; Avio *et al.*, 2015). Sin embargo, es necesario realizar más estudios para determinar los métodos más adecuados de detección, distribución y efectos de los distintos tipos y tamaños de microplásticos.

El objetivo de este trabajo es poner a punto la metodología para detectar dos tipos de microplásticos (poliestireno y polimetilmetacrilato) en *Mytilus galloprovincialis*, describir su distribución celular y tisular, y determinar sus efectos con ayuda de biomarcadores celulares y tisulares.

3. Materiales y métodos

Debido a la variabilidad, tanto en tamaño como tipo, de microplásticos presentes en el mar se realizaron dos experimentos, utilizando microesferas de poliestireno y de polimetilmetacrilato (PMMA).

3.1. Recogida de las muestras

Todos los mejillones fueron recogidos en el estuario de Butrón, en Plentzia, Vizcaya, 43°24'33.6"N 2°56'51.5"W (**Fig. 1**). 85 ejemplares fueron recogidos en Febrero de 2015 para el

experimento con microesferas de poliestireno y 42 en Septiembre del mismo año para el experimento con microesferas de PMMA.



Figura 1. Estuario de Butrón, punto de recogida de las muestras (marcado en rojo). Imagen tomada de GoogleMaps.

Tras su recogida, los especímenes fueron aclimatados en agua de mar filtrada en circuito abierto en el PiE (Plentziako itsas Estazioa) durante un periodo de una semana. Durante dicho periodo, se suministró una toma de comida comercial (Coraliquid, Sera, Heinsberg, Alemania) para evitar el ayuno durante muchos días y no deteriorar la salud general de los mejillones. Después, se dejó de suministrar alimento para limpiar el tracto digestivo.

3.2. Exposición a microplásticos y tratamiento de tejidos

Los 85 ejemplares empleados en el experimento con microesferas de poliestireno fueron divididos en 4 grupos experimentales en botes de 1 l: el grupo control, con agua de mar filtrada en $0,22\ \mu\text{m}$, y los 3 grupos que, además de contener agua de mar filtrada en $0,22\ \mu\text{m}$ fueron expuestos a un número y tamaño distinto de microplásticos comerciales (Alfa Aesar, Ward Hill, Massachusetts, EEUU). Uno de ellos se expuso a microesferas de $6\ \mu\text{m}$ de diámetro (20.000 microesferas/ml), otro a $10\ \mu\text{m}$ (20.000 microesferas/ml) y otro a $90\ \mu\text{m}$ (350 microesferas/ml).

Al tiempo 0 se tomaron 5 mejillones. A continuación, los mejillones se introdujeron en los botes de 1 l y se añadió a cada uno de los grupos la concentración de microesferas correspondiente, no añadiendo nada al grupo control, y se tomaron muestras a las 1, 4, 8 y 72 horas de exposición. En cada tiempo se tomaron 5 mejillones de cada grupo experimental (control, $6\ \mu\text{m}$, $10\ \mu\text{m}$ y $90\ \mu\text{m}$) y se diseccionaron extrayendo la glándula digestiva, branquias y gónadas.

Los 42 ejemplares empleados en el experimento con microesferas de PMMA se introdujeron en un bote de 2,5 l con agua de mar filtrada en $0,22\ \mu\text{m}$ al que se añadieron 0,5 g de PMMA (aprox. 5.000 microesferas/ml). Estas microesferas fueron cedidas por el Departamento de Química Física de

la Universidad del País Vasco (Prof. José Luis Vilas). El tamaño de las microesferas oscilaba entre 4 y 190 μm de diámetro distribuidas en distintas proporciones (**Fig. 2**).

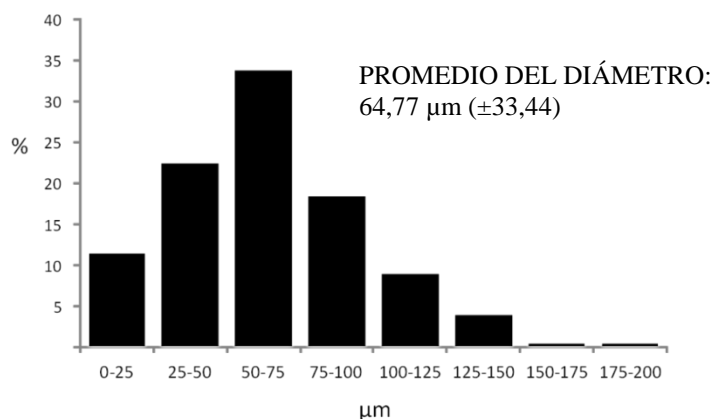


Figura 2. Distribución de los diámetros de los microplásticos de PMMA.

Al tiempo 0 se tomaron 6 mejillones, que corresponderían el grupo control. Después, los mejillones se introdujeron en el bote de 2,5 l, se añadieron las microesferas de PMMA y se tomaron 6 muestras a los 5 minutos, 1, 4, 8, 24 y 72 horas de exposición. A continuación, se separó el cuerpo del mejillón de la concha para ser procesado posteriormente.

Junto con la exposición a las microesferas se añadieron (incluyendo al grupo control del experimento con poliestireno) 2 ml de una disolución de microalgas (*Isochrysis galbana* a una concentración aproximada de 6.000.000 algas/ml) con el fin de estimular la apertura y filtración de los mejillones.

Los tejidos diseccionados en ambos experimentos fueron cortados por la mitad. Una mitad fue fijada en formalina (formaldehído al 4% en agua de mar filtrada) durante 24 horas en una cámara frigorífica a 4°C y después introducidos en etanol 70%; y la otra se congeló en nitrógeno líquido, a -196 °C, y se almacenó a -80 °C para ser cortada mediante criostato.

3.3. Procesamiento de las muestras

En ambos experimentos las muestras fijadas fueron teñidas con hematoxilina-eosina (H-E) y las muestras congeladas fueron teñidas con azul de toluidina para tener una visión topográfica de los microplásticos. No obstante, las muestras congeladas del experimento con poliestireno no se incluyen en este trabajo. Por otro lado, las muestras congeladas del experimento con PMMA fueron tratadas con técnicas histoquímicas para la medición de dos biomarcadores: lipofuscinas y lípidos neutros.

3.3.1. Procesamiento muestras fijadas

Las muestras introducidas en etanol 70% se deshidrataron e incluyeron en el *Tissue processor* (Leica ASP300, Leica, Viena, Austria), el proceso realizado se muestra en la **Tabla 1**. Ulteriormente,

las muestras fueron incluidas en moldes de parafina, se cortaron secciones de 5 μm de grosor con el microtomo (Leica RM2125RTS, Leica, Viena, Austria) y se dejaron secar durante aproximadamente 24 horas a 37°C.

Tabla 1. Procesamiento histológico del *Tissue processor*

Paso	Tiempo
70% Etanol	1 hora
96% Etanol	1 hora
96% Etanol	1 hora
Etanol absoluto	1 hora
Etano absoluto	1 hora
Xilol:Etanol absoluto en dilución 1:1	1 hora
Xilol	1 hora
Xilol	1 hora
Parafina (55 - 60°C)	2 horas
Parafina (55 - 60°C)	2 horas
Parafina (55 - 60°C)	2 horas

A continuación, se realizó la tinción H-E (Leica AutostainerXL, Leica, Viena, Austria) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Tinción Hematoxilina-Eosina

Paso	Tiempo	Paso	Tiempo
1 Xileno	10 min.	12 Carbonato de Litio	10 seg.
2 Xileno	10 min.	13 H ₂ O	1 min.
3 Etanol absoluto	2 min.	14 Eosina	90 seg.
4 Etanol absoluto	2 min.	15 H ₂ O	1 seg.
5 Etanol 96%	2 min.	16 H ₂ O	2 min.
6 Etanol 96%	2 min.	17 Etanol 70%	2 min.
7 Etanol 70%	2 min.	18 Etanol 96%	2 min.
8 H ₂ O	5 min.	19 Etanol absoluto	2 min.
9 Hematoxilina	4 min.	20 Etanol absoluto	2 min.
10 Alcohol ácido	10 seg.	21 Xileno	5 min.
11 H ₂ O	5 min.	22 Xileno	5 min.

Para finalizar, se montaron las muestras con medio de montaje DPX (Leica CV5030, Leica, Viena, Austria) y se comenzó a observar a microscopía óptica.

3.3.2. Procesamiento muestras congeladas

Las muestras congeladas fueron cortadas en secciones de 10 µm con el criostato (Leica CM 3050S, Leica, Viena, Austria). A continuación, se realizó la tinción azul de toluidina y se realizaron las técnicas histoquímicas de Oil Red O y Lipofuscinas de Schmorl.

3.3.2.1. Azul de Toluidina

Las muestras fueron teñidas con azul de toluidina al 1% en agua destilada y se montaron con *Kaiser's glycerol gelatine* a 37°C.

3.3.2.2. Lipofuscinas de Schmorl

El procesamiento fue realizado siguiendo el protocolo de Bancroft & Gamble (2002). Tras la fijación con Baker en formol cálcico (pH = 7), se tiñeron con el reactivo de Schmorl y, finalmente, se montaron las muestras con *Kaiser's glycerol gelatine* a 37°C.

3.3.2.3. Oil Red O (ORO)

El procesamiento fue realizado siguiendo el protocolo de Culling (1974). Tras la fijación con Baker en formol cálcico (pH = 7), se procedió a teñir con ORO y el colorante de contraste Fast Green FCF. Finalmente, las muestras se montaron con *Kaiser's glycerol gelatine* a 37°C.

3.4. Observación de las muestras y tratamiento estadístico

3.4.1. Muestras fijadas

Se observó el sexo, presencia de parásitos y estado general de los ejemplares fijándose principalmente en las gónadas, branquias y en la glándula digestiva empleando, exclusivamente, la microscopía de campo claro. Los estadios gonadales se determinaron teniendo en cuenta los descritos por Hillman (1993), en los que se pueden diferenciar 6 niveles de desarrollo (**Tabla 3**).

Tabla 3. Fase e índice (GI) gonadal según Hillman (1993).

	Fase	GI	Descripción Histológica
Gónadas en reposo	I	1	Gónadas inactivas. El tejido conectivo puede observarse con facilidad.
Gónadas en desarrollo	II	2	La gametogénesis ha comenzado pero los gametos no pueden ser diferenciados sexualmente
	III	3	Los folículos gonadales y el tejido conectivo ocupan el mismo área. Los gametos pueden diferenciarse fácilmente. Los folículos presentan gametos en desarrollo y maduros.
Gónadas maduras	IV	5	Las gónadas están completamente desarrolladas y los folículos ocupan la mayor parte del manto. Los folículos presentan gametos maduros.
Puesta de los gametos	V	4,3,2	La puesta de gametos ha comenzado, pero los gametos todavía están presentes en los folículos.
	VI	0	Sólo se observan folículos vacíos con algunos gametos residuales

El ratio CTD, tejido conectivo intersticial respecto a divertículos digestivos, fue empleado como biomarcador para conocer el estado de los mejillones, aportando información sobre la integridad de la glándula digestiva. Para ello, se calculó el porcentaje que ocupaba el tejido conectivo intersticial respecto a los divertículos digestivos y se realizó un análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y un análisis post hoc, Duncan, con el programa SPSS v.22 (IBM, SPSS Statistics), ambas con un nivel de significación de 0,05. El cálculo se realizó tomándose fotos a un aumento 20x mediante microscopía de campo claro en 3 zonas seleccionadas de la glándula digestiva de cada muestra. Por medio de un sistema de análisis de imagen, Image J (National Institutes of Health, USA), se midió la proporción de células basófilas (b), células digestivas (d) y los lúmenes de los divertículos (l). Posteriormente se calculó la proporción de tejido conectivo intersticial (c) haciendo $100 - (b + d + l)$. Finalmente se calculó el ratio $CTD = c / (b + d + l)$ (Brooks *et al.*, 2012).

3.4.2. Muestras congeladas

Con la tinción de azul de toluidina se contabilizaron las microesferas y se observó su posición en los tejidos. Este proceso también se realizó con las muestras para ORO y Schmorl.

Por otra parte, en las muestras teñidas con Schmorl se calculó la proporción de lipofuscina (VvLP) en la muestra respecto al tejido epitelial. Lo mismo se realizó con las muestras teñidas con ORO, pero para conocer a proporción de lípidos neutros (VvNL) respecto a la de tejido epitelial. Para ello, se empleó microscopía óptica de campo claro y un sistema de análisis de imagen, Image J (National Institutes of Health, USA). Los resultados se compararon a los distintos tiempos por medio de un análisis de la varianza de un factor (ANOVA) con el programa SPSS v.22 (IBM, SPSS Statistics) y un análisis post hoc, Duncan, ambas con un nivel de significación de 0,05.

4. Resultados

4.1. Detección de microplásticos

Los dos tipos de microplásticos, poliestireno y PMMA, han sido detectados a microscopía óptica en muestras congeladas (**Fig. 3**). En las muestras fijadas, en cambio, no se han observado los microplásticos como tal, pero sí sus efectos en la glándula digestiva. Así, en las muestras fijadas sólo se observó la presencia de microplásticos que se encontraban recubiertos por material que estaba siendo digerido o de un tamaño suficientemente grande como para deformar los tejidos de los mejillones.

En las muestras fijadas del experimento con poliestireno sólo se detectó la presencia de microplásticos en el grupo expuesto a microesferas de 90 μm de diámetro (**Fig. 3A**). En las muestras fijadas del experimento de PMMA (**Fig. 3B**) se detectaron microplásticos de tamaño variado, todos ellos de un diámetro mayor a 30 μm , si bien pudieron detectarse algunos de 10 μm .

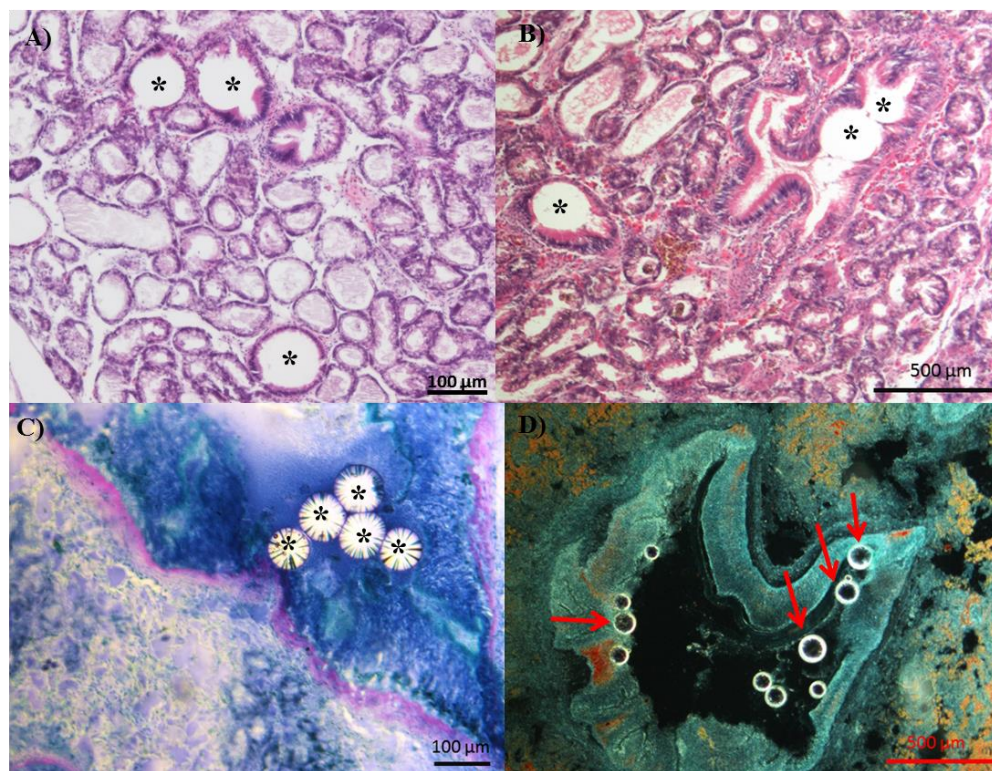


Figura 3. (A) Detección de microesferas de poliestireno con tinción H-E tras 1 hora de exposición. Detección de microesferas de PMMA con (B) tinción de H-E tras 4 horas de exposición, y tras 24 horas de exposición con (C) tinción de azul de toluidina y (D) tinción de ORO empleando la iluminación de campo oscuro. Las microesferas se encuentran marcadas mediante un asterisco o flecha.

Por otro lado, en las muestras congeladas las microesferas de PMMA se observaron de manera directa tanto a microscopía de campo claro como de campo oscuro. Sin embargo, se observaron variaciones a la hora de detectar los microplásticos en función de la tinción realizada. En las muestras

teñidas con ORO (**Fig. 3D**) y Schmorl los microplásticos se detectaron fácilmente a campo claro y campo oscuro, en este último las microesferas mostraban refringencia lo que permitió su rápida detección. En las muestras teñidas con azul de toluidina (**Fig. 3C**), por el contrario, las microesferas de PMMA eran menos refringentes que en las muestras de ORO y Schmorl. Por consiguiente, su detección fue más sencilla con la iluminación de campo claro, en el que aparecen en algunos casos, inserciones del tinte en el propio microplástico.

Los tamaños de los microplásticos que se detectaron en las muestras congeladas fueron variados, desde microesferas de gran tamaño (máximo 130 μm) a pequeñas (< 10 μm).

4.2. Distribución de microplásticos en los tejidos

Las microesferas fueron detectadas al poco tiempo de ser expuestas: pasada una hora el 80% de los individuos expuestos a microesferas de poliestireno de 90 μm las presentaban, y a los 5 minutos el 66,67% de los ejemplares del experimento con PMMA (**Fig. 4**). Además, el tiempo que los microplásticos permanecieron en los ejemplares fue distinto en ambos microplásticos. Tras 72 horas de exposición, la proporción de individuos que presentaban microplásticos de poliestireno era la misma que cuando empezaron a observarse; mientras que en el caso de las microesferas de PMMA a partir de las 8-24 horas el número de microesferas fue en descenso hasta detectarse únicamente en el 17% de las muestras de 72 horas.

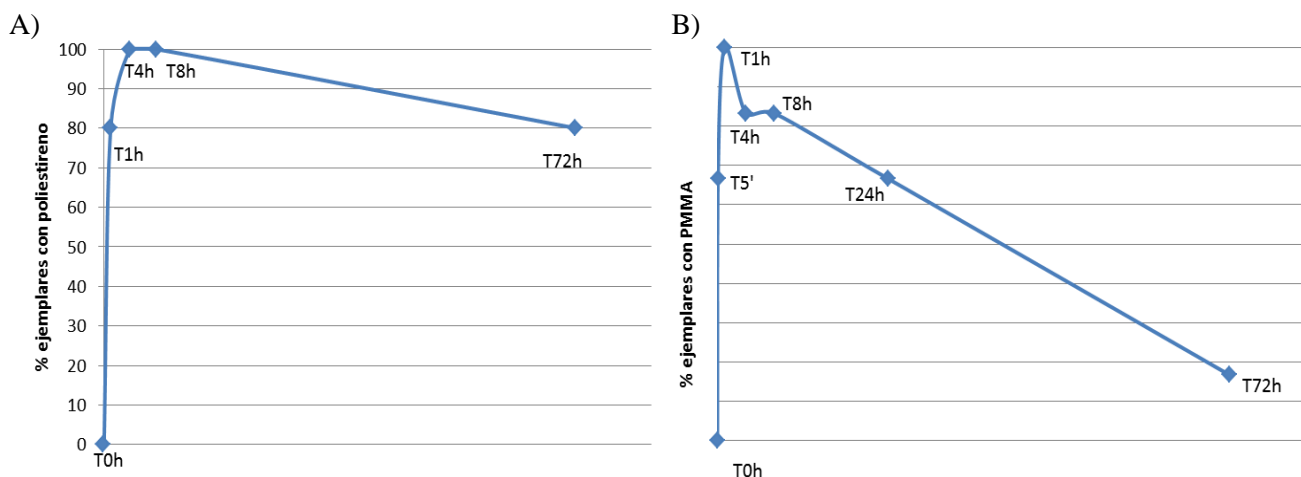


Figura 4. Porcentaje de ejemplares con microesferas de (A) poliestireno de 90 μm de diámetro y (B) PMMA que presentan microplásticos.

Por otro lado, los lugares de detección de microplásticos fueron variados (**Fig. 5**). En el experimento con poliestireno sólo se contaba con las muestras fijadas, de modo que la detección de los microplásticos fue más limitada que en el experimento con PMMA.

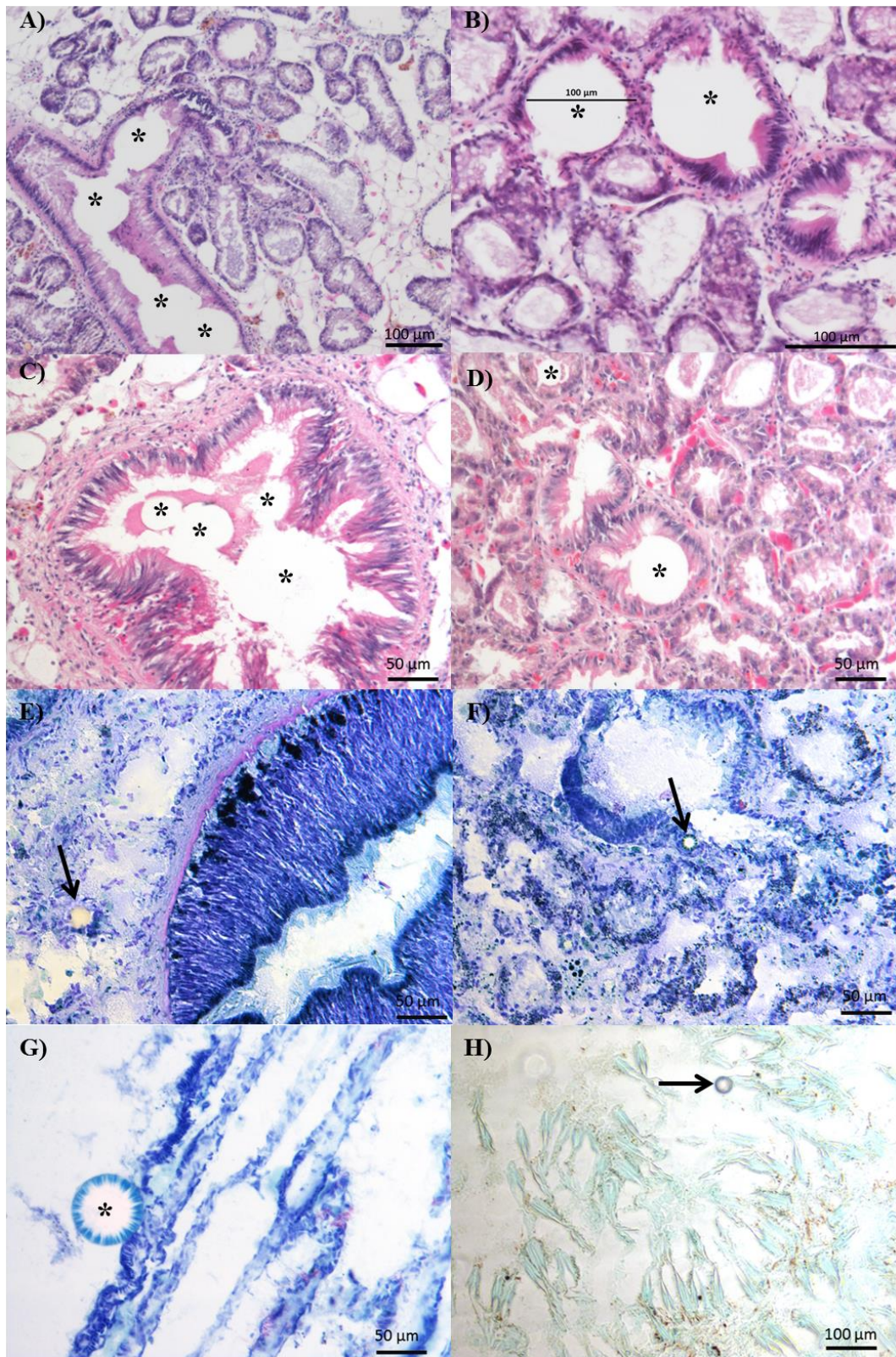


Figura 5. Detección de microesferas de poliestireno con tinción H-E tras 1 hora de exposición (A) en estómago/intestino y (B) en conductos digestivos. Detección de microesferas de PMMA con tinción H-E (C) en intestino/estómago tras 1 hora de exposición y (D) tras 8 horas en conducto digestivo; con tinción azul de toluidina tras 1 hora en (E) tejido conjuntivo, (F) epitelio del conducto digestivo y tras 4 horas en branquia (G) y con tinción ORO en branquia (H). Los microplásticos se encuentran marcados mediante asterisco o flecha. En la imagen B se observa una barra de escala de 100 μm que nos indica el tamaño aproximado de la microesfera.

En el experimento con poliestireno únicamente pudo confirmarse la presencia de microplásticos en el intestino, estómago (**Fig. 5A**) y los conductos primarios de la glándula digestiva (**Fig. 5B**). También se observaron marcas circulares en otros tejidos pero no se pudo corroborar que se tratase de microesferas.

En el experimento con PMMA los lugares en los que se detectaron las en las muestras fijadas fueron los mismos que para el poliestireno (conductos primarios, estómago e intestino) (**Fig. 5C y D**). En las muestras congeladas, los microplásticos se detectaron además de en los lugares observados en las muestras fijadas, en las branquias, tejidos conjuntivo, en los epitelios de los conductos de la glándula digestiva (**Fig. 5E, F y G**) y en las inmediaciones de la gónada, aunque este último caso no es tan evidente.

En ambos experimentos, aunque con las microesferas de PMMA de forma más clara, se observó cómo los microplásticos de mayor tamaño se encontraban exclusivamente en el intestino, estómago, conductos más grandes y branquias; mientras que, los microplásticos de menor tamaño (menos de 20 μm , aprox.) además de encontrarse en todos estos lugares aparecen en el tejido conjuntivo, epitelio digestivo, conductos secundarios e inmediaciones de la gónada.

4.3. Estudio de los efecto de los microplásticos

No se observaron diferencias significativas en el desarrollo gonadal a lo largo de cada experimento. La mayoría de los ejemplares estudiados en el experimento con poliestireno se encontraban en fases de maduración, mientras que, los del experimento con PMMA se encontraban en la fase de puesta o comienzo del desarrollo gametogénico. Las excepciones observadas en cada uno de los experimentos estaban representadas por ejemplares infectados por parásitos o con gónadas atrésicas (**Fig. 6**).

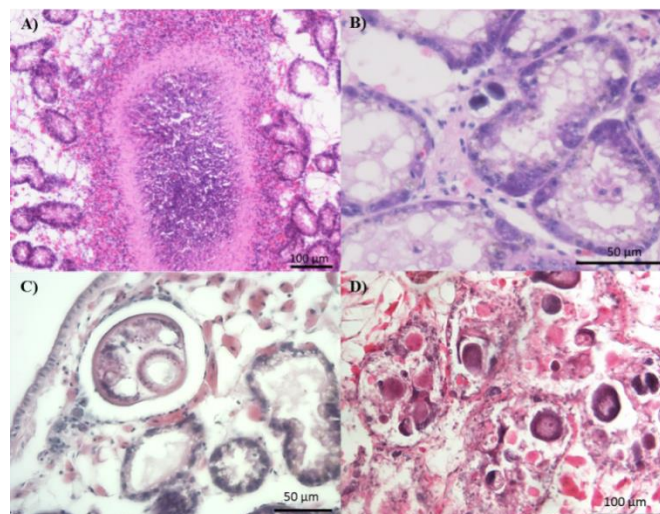


Figura 6. (A) Granulocitoma en la glándula digestiva. Parásitos en la glándula digestiva: (B) Nematopsis y (C) Metacercaria. (D) Gónada con atresia y necrosis.

Por otro lado, el ratio CTD resultó no variar a lo largo del tiempo en el experimento con poliestireno ($p > 0,05$, **Fig. 7 y 8**). Sin embargo, se observaron diferencias entre el ratio CTD a lo largo del tiempo entre los ejemplares control y los expuestos a microplásticos. En el grupo control el ratio fue muy variable en todos los tiempos. Asimismo, se observó un incremento del ratio a las horas 1 y 4 de exposición respecto a los tiempos 0, 8 y 72 horas. En los ejemplares expuestos a microplásticos en cambio, las variaciones fueron relativamente bajas en todos los tiempos y las medias del ratio se mantuvieron prácticamente constantes.

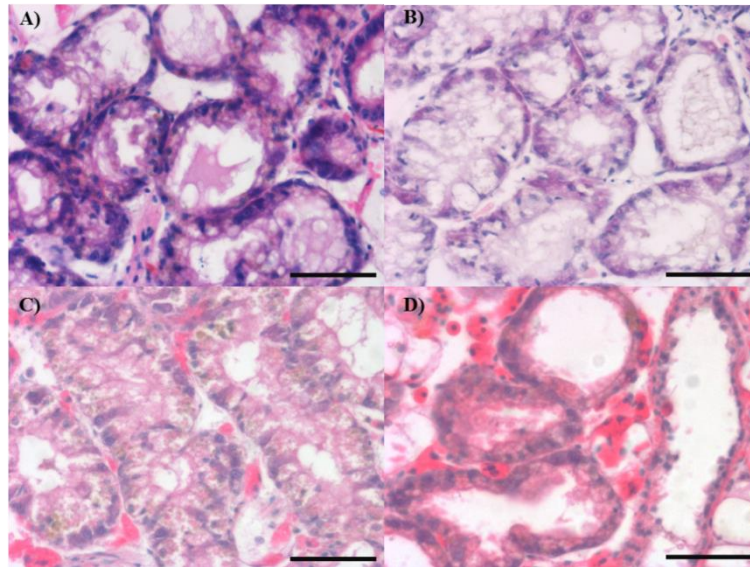


Figura 7. Glándula digestiva del experimento de poliestireno tras (A) 0 horas y (B) 72 horas de exposición a microesferas de 90 μm de diámetro; y del experimento de PMMA tras (C) 0 horas y (D) 72 horas. Nótese que en el experimento con poliestireno al comienzo y final del experimento el espacio que ocupan los divertículos digestivos es semejante, mientras que en el experimento con PMMA a las 72 horas el espacio que ocupan los divertículos digestivos es considerablemente menor que a las 0 horas. Barra de escala: 50 μm .

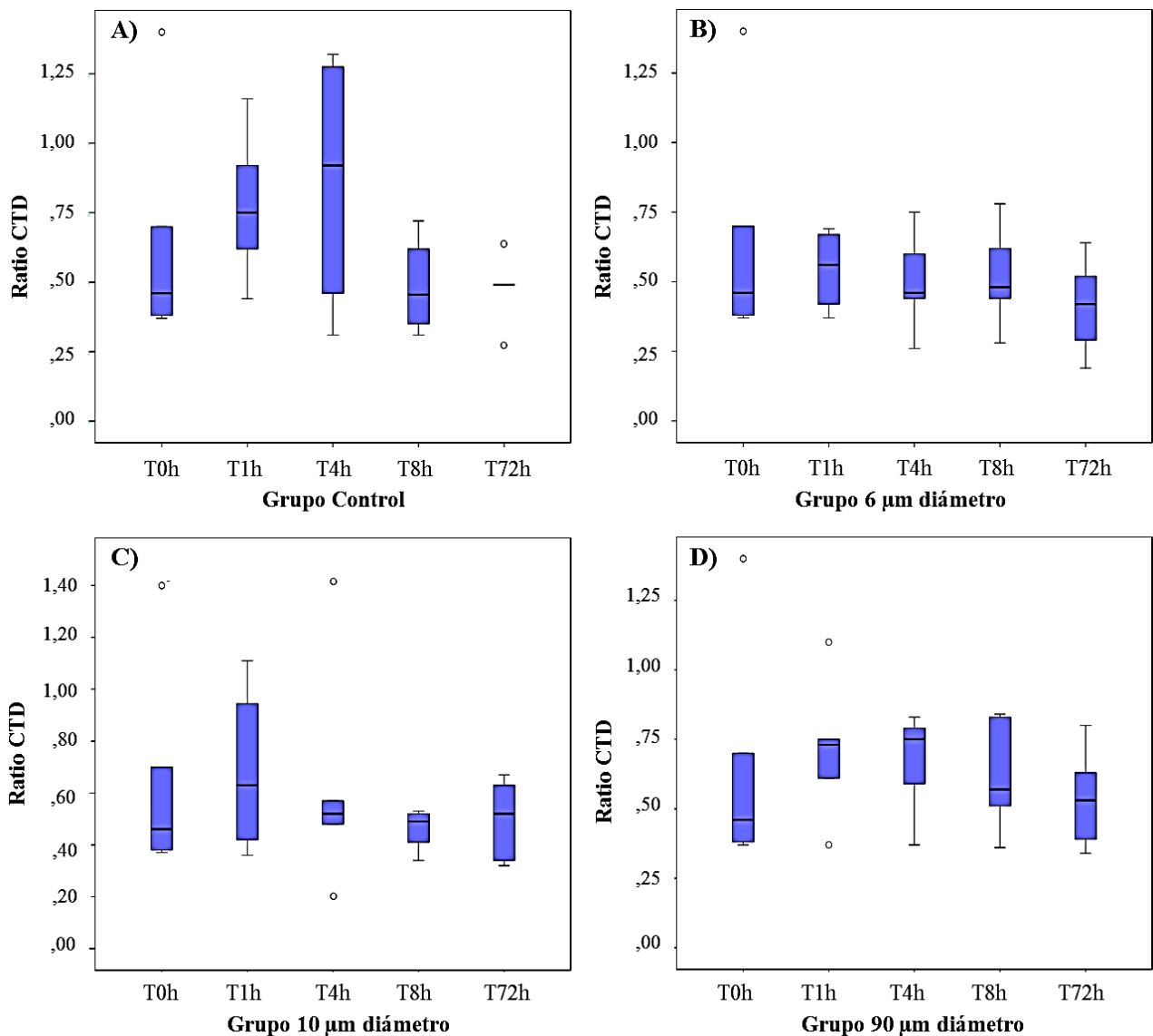


Figura 8. Ratio del tejido conectivo respecto a los divertículos digestivos (ratio CTD) en la glándula digestiva del experimento con poliestireno. (A) Grupo control; y grupos expuestos a microesferas de poliestireno de (B) 6μm, (C) 10μm y (D) 90μm de diámetro. En el diagrama de cajas aparecen representados: la mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (parte inferior y superior de la caja), percentil 5 y 95 (bigote inferior y superior) y valores atípicos y extremos (círculos).

El ratio CTD tampoco varió a lo largo del tiempo en el experimento con PMMA ($p > 0,05$) (Fig. 7 y 9). Sin embargo, se observaron diferencias en cuanto a la variabilidad de las muestras. A las 4 horas se observó una gran variabilidad adquiriendo valores del ratio más altos que el resto.

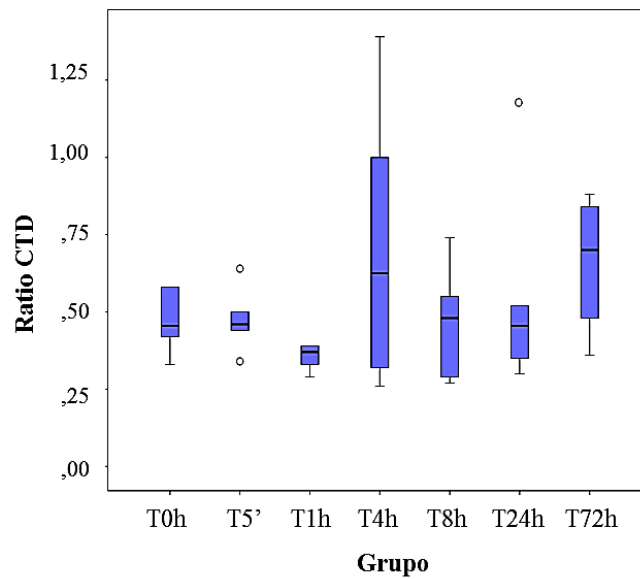


Figura 9. Ratio del tejido conectivo respecto a los divertículos digestivos (ratio CTD) en la glándula digestiva del experimento con PMMA. En el diagrama de cajas aparecen representados: la mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (parte inferior y superior de la caja), percentil 5 y 95 (bigote inferior y superior) y valores atípicos y extremos (círculos).

Finalmente, en este mismo experimento se observó la proporción de lipofuscinas y lípidos neutros (**Fig. 10**) en las muestras congeladas y se midió el $V_v(LP)$ y $V_v(NL)$ (**Fig. 11**). El análisis ANOVA de un factor indicó que el $V_v(LP)$ era similar para todos los tiempos ($p > 0,05$), pero el análisis post hoc Duncan indicó que existían diferencias significativas entre los tiempos 0 y 72 horas de exposición (**Fig. 11A**). Por el contrario, la medición de $V_v(NL)$ indicó que no existían diferencias significativas en cuanto a la proporción de lípidos neutros a lo largo del tiempo ($p > 0,05$, **Fig. 11B**).

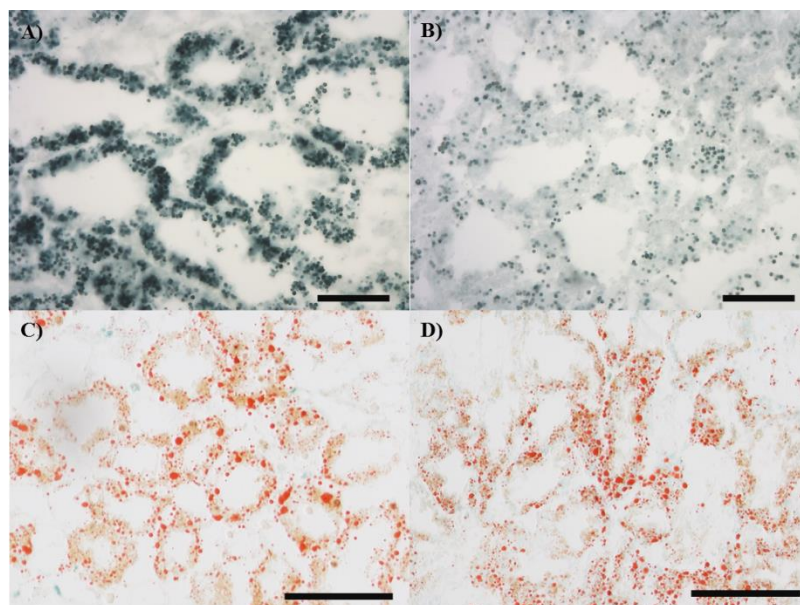


Figura 10. Glándula digestiva expuesta a microesferas de PMMA y teñida mediante la tinción para lipofuscinas tras (A) 0 horas y (B) 72 horas, y teñidas mediante ORO tras (C) 0 hora y (D) 72 horas. Nótese que la cantidad de lipofuscinas al inicio del experimento es mucho mayor que a las 72 horas, mientras que la cantidad de lípidos neutros no varía. Barra de escala: 100 μ m.

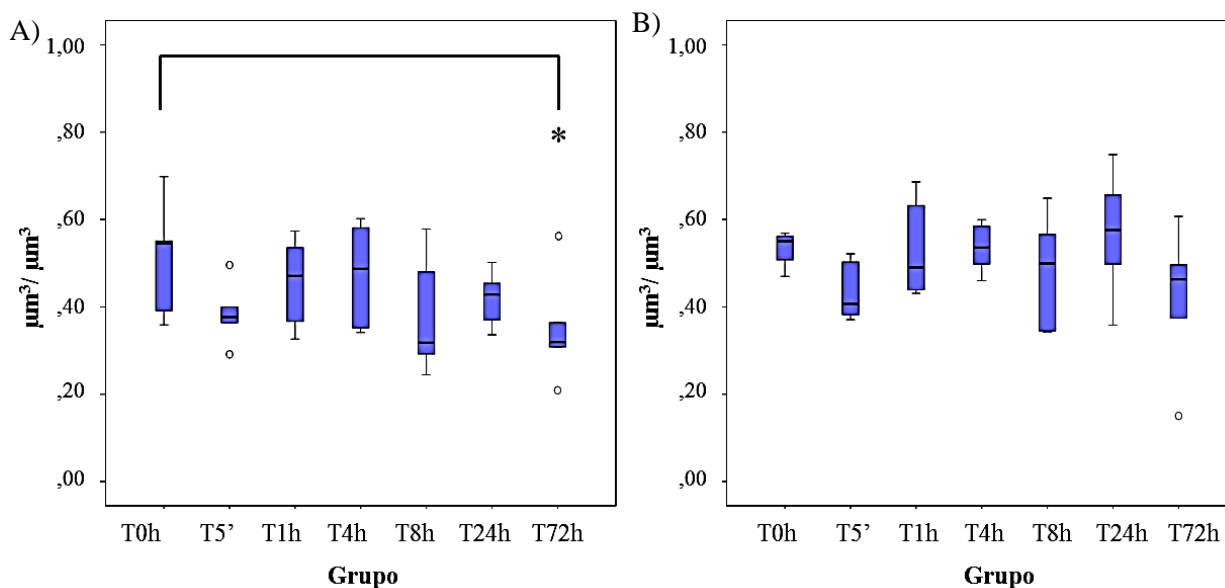


Figura 11. Densidad del volumen de lipofuscinas (A) y de lípidos neutros (B) en la glándula digestiva de los ejemplares del experimento con PMMA. En el diagrama de cajas aparecen representados: la mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (parte inferior y superior de la caja), percentil 5 y 95 (bigote inferior y superior) y valores atípicos y extremos (círculos). Los asteriscos indican una diferencia significativa a un nivel de $p < 0,05$.

5. Discusión

5.1. Detección de los microplásticos

En los últimos años el interés por los microplásticos está creciendo. Para poder estudiar su distribución y efectos en los organismos es necesario contar con métodos de detección de microplásticos eficientes. Los métodos más empleados hasta ahora son, al menos parcialmente, destructivos y no permiten relacionar directamente los efectos causados en los organismos por la ingestión de microplásticos. Por esa razón, es necesario el desarrollo de métodos alternativos que permitan observar los microplásticos directamente en los organismos. Las técnicas microscópicas son un instrumento muy poderoso que ya han sido empleados de manera satisfactoria en muestras cortadas con el criostato y observadas con luz polarizada, iluminación de campo claro y microscopía de fluorescencia (Browne *et al.*, 2008; Von Moos *et al.*, 2012; Avio *et al.*, 2015).

En este trabajo se ha determinado que las muestras fijadas no son una buena elección para observar los microplásticos. Sólo puede detectarse su presencia debido a la deformación que sufren los tejidos por las microesferas durante el proceso de fijación. Muchas de las deformaciones observadas son circulares. No obstante, algunas no lo son, lo que puede deberse a la compresión sufrida por los tejidos al ser fijados. Sin embargo, debido a su tamaño, distribución y morfología del epitelio intestinal, del estómago o de los propios conductos que los rodean consideramos que se trata de microplásticos. La causa por la cual los microplásticos se lavan en el procesamiento todavía es desconocida, pero el xilol, sustancia que se utiliza en el procesamiento, es uno de los solventes que

disuelve el poliestireno extruido (García *et al.*, 2009), lo que explica la no presencia de microplásticos en las muestras procesadas para parafina y teñidas con H-E.

Por otro lado, se ha demostrado que tanto la microscopía de campo claro como la de campo oscuro, no descrita hasta el momento, son buenas elecciones a la hora de observar microplásticos de PMMA en muestras congeladas. Estudios paralelos realizados en el laboratorio han confirmado que ocurre lo mismo con las microesferas de poliestireno. Sin embargo, se ha determinado que dependiendo del microplástico las tinciones y condiciones de iluminación empleadas deberán ser distintas. A pesar de no ser tinciones topográficas, las microesferas de PMMA se observan mejor a microscopía de campo oscuro para las muestras de ORO o Schmorl, en las que los microplásticos son refringentes. Desconocemos por qué las microesferas de PMMA congeladas y teñidas con azul de toluidina muestran menor refringencia a microscopía de campo oscuro; pero puede deberse a que el tinte recubre las microesferas, como puede observarse con las inserciones del tinte en el interior del microplástico, impidiendo su refracción de luz. En las microesferas de poliestireno, por el contrario, la mejor manera de detectar los microplásticos es a microscopía de campo claro u oscuro con la tinción de azul de toluidina.

Además, otros estudios realizados en el laboratorio han determinado que la microscopía de luz polarizada también es adecuada para la detección de microplásticos. No obstante, las microesferas de poliestireno muestran una mayor refringencia que las de PMMA, lo que indica que esta técnica es más valiosa para la detección de poliestireno que para PMMA.

Los resultados indican que los métodos microscópicos son útiles para la detección de microplásticos sin necesidad de dañar tejidos. De este modo, pueden ser estudiados de manera más exhaustiva y obtener información sobre los tejidos diana y sobre sus posibles efectos en los organismos. Sin embargo, dependiendo de los microplásticos empleados, hay unos métodos más adecuados que otros para su detección, probablemente debido a las propiedades químicas que pueden interaccionar con los tintes.

5.2. Distribución de los microplásticos en los tejidos

Estudios previos demostraron la ingestión de microesferas tras 3 y 12 horas de exposición para el polietileno y poliestireno, respectivamente (Browne *et al.*, 2008; Von Moos *et al.*, 2012). En el presente experimento se ha determinado que los tiempos de ingestión son considerablemente menores a los descritos hasta el momento. Las microesferas de poliestireno se observaron tras 1 hora de exposición, mientras que las de PMMA se observaron a los 5 minutos.

Por otro lado, los tiempos de prevalencia en los organismos parecen variar con el tipo de microplástico. La prevalencia de las microesferas de PMMA fue baja pasadas 72 horas, en las microesferas de poliestireno, en cambio, fue elevada. Esto último ya se había observado previamente

en otros estudios, en los que las microesferas de poliestireno permanecían en los organismos al menos 48 días (Browne *et al.*, 2008).

Estas diferencias podrían deberse a propiedades químicas variables entre los microplásticos. No obstante, hay que tener en cuenta que también pueden deberse a que en el experimento con poliestireno las concentraciones de microesferas a las que fueron expuestos los mejillones fueron mayores que en el experimento con PMMA.

Por otra parte, la distribución de los microplásticos ha sido descrita sobre todo en la glándula digestiva: en el lumen del intestino, conductos primarios y secundarios, y en las vacuolas de las células digestivas (Browne *et al.*, 2008; Von Moos *et al.*, 2012; Avio *et al.*, 2015). Asimismo, se han encontrado en la hemolinfa, branquias y tejido conectivo (Browne *et al.*, 2008; Von Moos *et al.*, 2012; Avio *et al.*, 2015), pero no de manera tan generalizada como en los tejidos anteriores. La distribución observada en este trabajo se ajusta a lo descrito en estudios previos. Vista la distribución de los microplásticos, entendemos que su ingestión es la misma que para los alimentos, pero con la limitación de que los microplásticos no son digeridos y su distribución se encuentra limitada por su tamaño. Esto explicaría que los microplásticos más grandes se queden en cavidades de gran tamaño, como el lumen de conductos primarios, intestino o estómago. Las microesferas de menor tamaño (menos de 20 μm , aprox.), por el contrario, son capaces de penetrar en otros tejidos, lo que explicaría su amplia distribución en el organismo.

La facilidad que presentan las microesferas de menor tamaño respecto a las de mayor tamaño para atravesar el epitelio intestinal y llegar a otros compartimentos ha sido descrita por Browne *et al.* (2008). La distribución de las microesferas por el organismo puede ser debida a la introducción de microplásticos en el interior de los hemocitos por un proceso de fagocitosis (Browne *et al.*, 2008; Von Moos *et al.*, 2012). Esto explicaría la translocación sólo de los microplásticos más pequeños, a tejidos distintos al lumen de los conductos, intestino y estómago.

5.3. Estudio de los efectos de los microplásticos

5.3.1. Ratio CTD

Los cambios en la integridad de la glándula digestiva debido a los contaminantes pueden cuantificarse mediante el ratio CTD. Un aumento en este ratio indicaría que se está produciendo un descenso de la integridad de la glándula digestiva, por lo que, en presencia de contaminantes es frecuente observar valores del ratio más altos (Brooks *et al.*, 2012). No obstante, este aumento también puede deberse a estrés ambiental, sin necesidad de la presencia de contaminantes (Múgica *et al.*, 2015).

En las muestras expuestas a poliestireno no se han encontrado cambios significativos en el ratio CTD, lo que nos indica que los microplásticos no modifican la integridad de la glándula digestiva en un periodo de 72 horas. Sin embargo, sí se perciben diferencias en este ratio entre el grupo control y los grupos expuestos a microplásticos.

En una situación normal se produce un cambio en el sistema endolisosómico de las células digestivas durante las siguientes 4 horas desde el momento de haber ingerido el alimento, lo que indicaría que el tiempo de digestión puede ser de aproximadamente 4 horas (Izagirre, 2007). En el grupo control del experimento con poliestireno se observa un aumento de la variabilidad del ratio CTD a las 4 horas de comenzar el experimento, lo que puede estar relacionado con una intensificación en el proceso de digestión. Los individuos que captarían la comida rápidamente a las 4 horas se encontrarían con una mayor cantidad de tejido conectivo (lo que daría lugar a un aumento del ratio CTD), mientras que los individuos que captasen la comida más tarde se encontrarían en fases de la digestión más tempranas adquiriendo valores del ratio CTD más bajos, ya que tendrían una mayor proporción de divertículos digestivos. Esto explicaría el aumento de la variabilidad a las 4 horas.

En las muestras del experimento con poliestireno expuestas a microesferas, por el contrario, no se observa este patrón de cambios en el ratio CTD. Mientras que el grupo control sufre cambios en el ratio a lo largo del tiempo, los ejemplares expuestos a microplásticos tienen una tendencia más lineal, que podría indicar que la digestión no se está realizando o está hasta cierto punto limitada. Estos resultados muestran que las microesferas de poliestireno entorpecen de alguna manera el proceso de digestión en la glándula digestiva.

Los ejemplares del experimento con PMMA en cambio, parece que tienen un comportamiento semejante al del grupo control del experimento con poliestireno, lo que permite deducir que estos microplásticos no afectan al proceso de digestión o que estas microesferas no producen daños en la glándula digestiva. Si bien son necesarios más estudios en profundidad para comprobar el efecto de diferentes microplásticos en la digestión.

5.3.2. Lipofuscinas y lípidos neutros

Las lipofuscinas y lípidos neutros son biomarcadores muy utilizados porque indican una respuesta a contaminantes (Moore *et al.*, 2008). Sin embargo, hasta el momento no se han detectado cambios significativos en estos biomarcadores en relación a los microplásticos (Von Moos *et al.*, 2012; Avio *et al.*, 2015).

Las lipofuscinas son los productos de la degradación oxidativa de lípidos y proteínas. Su composición es variable, pero se encuentran compuestos principalmente por triacilglicéridos, ácidos grasos, colesterol y fosfolípidos, aunque también aparecen aminoácidos, carbohidratos y algunos metales (Terman & Brunk, 2004). Un aumento de la cantidad de lipofuscinas en la glándula digestiva

puede estar relacionado con la contaminación (Moore *et al.*, 2008). A pesar de ello, en los estudios realizados con microplásticos no se ha detectado dicho aumento (Von Moos *et al.*, 2012; Avio *et al.*, 2015). En el presente estudio, en cambio, se observa un descenso de lipofuscinas tras la exposición a microesferas de PMMA entre los tiempos 0 y 72 horas.

En la tinción histoquímica de Schmorl no todos los elementos teñidos corresponden a lipofuscinas, algunos de ellos pueden ser autofagolisosomas o lisosomas en distintos estados de degradación. Los mejillones pertenecientes al tiempo 0 permanecieron 3-4 días en ayuno, lo que habría dado lugar a un aumento de autofagolisosomas y, consecuentemente, un Vv(LP) elevado.

El descenso observado a las 72 horas, por su parte, podría ser debido a dos procesos: el cese de la digestión y/o la liberación de lipofuscinas. Debido al diseño experimental del trabajo los mejillones sólo fueron alimentados al inicio del experimento (después de la recogida de los ejemplares del tiempo 0). Al principio, los mejillones ingerirían rápidamente la comida, provocando un aumento de lisosomas y haciendo que el Vv(LP) continuase siendo alto a pesar de la reducción de la cantidad de autofagolisosomas. A medida que el experimento avanzase la cantidad de alimento descendería, ocasionando un cese de la digestión y provocando que a las 72 horas sólo quedasen teñidas mediante esta técnica las lipofuscinas, reduciendo el Vv(LP). Por otra parte, las lipofuscinas podrían liberarse junto con las heces tras la digestión, reduciendo así el Vv(LP).

Ninguno de estos dos procesos, al tratarse de procesos naturales, constituiría un daño para el organismo, de modo que estos resultados nos estarían indicando que las microesferas de PMMA no son perjudiciales para los organismos, por lo menos, a las concentraciones empleadas y en un periodo de 72 horas. No obstante, los resultados no son concluyentes y se precisan nuevos estudios.

Por otro lado, los lípidos neutros se almacenan en la glándula digestiva y son utilizados como material de reserva en la gametogénesis durante otoño e invierno, o para hacer frente a los periodos de estrés (Gosling, 2004). Cuando se producen alteraciones en las células digestivas o hay contaminación se produce una acumulación anormal de lípidos neutros insaturados (Moore, 1988; Moore *et al.*, 2008). Esto hace que sea un buen indicador de la exposición a algunos contaminantes, como los hidrocarburos (Marigómez & Baybay-Villacorta, 2003). Al igual que en estudios anteriores con microplásticos (Von Moos *et al.*, 2012; Avio *et al.*, 2015), no se han observado diferencias en cuanto a la cantidad lipídica en las glándulas digestivas. Por lo tanto, los microplásticos de PMMA no producen un estrés lo suficientemente grande como para inducir la acumulación de lípidos ni digerirlos a corto plazo.

Los tres biomarcadores han revelado nuevamente las diferencias existentes entre los dos microplásticos empleados, el poliestireno y el PMMA. Mientras que las microesferas de poliestireno dificultan el proceso de digestión, las de PMMA permiten que éste siga ocurriendo. Asimismo, los

valores de lipofuscinas y lípidos neutros en el experimento realizado con PMMA indican que el funcionamiento de la glándula digestiva no se ve comprometido por la presencia de microplásticos. No obstante, como ya se ha mencionado anteriormente, estas diferencias podrían deberse a las distintas concentraciones de microplásticos en ambos experimentos o a sus distintas propiedades químicas.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran diferencias en la detección, distribución y efectos en *Mytilus galloprovincialis* relacionadas con el tipo de microplásticos. Ahora bien teniendo en cuenta la morfología y composición variable de los microplásticos en el campo, y los conocimientos sobre tiempos de persistencia, modo y tiempos de digestión, distribución y efectos, concluimos que son necesarios estudios más detallados. Desde un punto de vista ecológico, una mayor investigación en este campo podría garantizar el buen funcionamiento de las comunidades biológicas, detener los procesos de bioacumulación y biomagnificación, frenar la entrada de contaminantes asociados en los organismos, etc. Por ello, es necesario profundizar más en el estudio de los microplásticos tanto en el género *Mytilus* como en otros organismos pertenecientes a la biota marina.

6. Conclusión

- Los métodos de detección son dependientes del tipo de microplástico.
- Las muestras congeladas son adecuadas para la observación de microplásticos.
- La ingestión de los microplásticos se produce de una manera rápida.
- La distribución de los microplásticos depende del tamaño de los mismos. Los microplásticos de menos de 20 μm (aprox.) se encuentran en tejido conectivo, epitelio y conductos más pequeños; mientras que los de un tamaño mayor se encuentran en estómago, intestino y conductos más grandes de la glándula digestiva.
- Se han observado diferencias en los tiempos de permanencia y efectos inducidos por las microesferas de poliestireno y PMMA. Así los mejillones expuestos a microesferas de poliestireno presentan mayores alteraciones y mayor persistencia de microplásticos, pero estas diferencias pueden estar más relacionadas con la concentración que con la composición.

7. Bibliografía

- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62: 1596-1605.
- Avio, C. G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L. & Regoli, F. (2015). Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution*, 198: 211-222.
- Barcroft, J. D., & Gamble, M. (2002). *Theory and Practice of Histological Techniques*. London: Churchill Livingstone. 796pp.
- Bayne, B. L. (1976). *Marine mussels: their ecology and physiology*. New York: Cambridge University Press. 511 pp.

- Bouwmeester, H., Hollman, P. C., & Peters, R. J. (2015). Potential health impact of environmentally released micro-and nanoplastics in the human food production chain: experiences from nanotoxicology. *Environmental Science & Technology*, 49: 8932-8947
- Brooks, S., Harman, C., Zaldibar, B., Izagirre, U., Glette, T., & Marigómez, I. (2011). Integrated biomarker assessment of the effects exerted by treated produced water from an onshore natural gas processing plant in the North Sea on the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin*, 62: 327-339.
- Brooks, S., Harman, C., Soto, M., Cancio, I., Glette, T., & Marigómez, I. (2012). Integrated coastal monitoring of a gas processing plant using native and caged mussels. *Science of the Total Environment*, 426: 375-386.
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., & Thompson, R. C. (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science & Technology*, 42: 5026-5031.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 62: 2588-2597.
- Culling, C. F. A. (1974). *Handbook of histopathology and histochemistry techniques*. (Third ed.). Guildford: Butterworths. 712 pp.
- Derraik, J. G. (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 842-852.
- Eriksen, M., Lebreton, L. C., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., Galgiani, F., Ryan, P. G. & Reisser, J. (2014). Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PLoS ONE*, 9: e111913
- Figueruelo, J. E., & Dávila, M. M. (2004). *Química física del ambiente y de los procesos medioambientales*. Barcelona: Reverte. 619 pp.
- García, M. T., Gracia, I., Duque, G., de Lucas, A., & Rodríguez, J. F. (2009). Study of the solubility and stability of polystyrene wastes in a dissolution recycling process. *Waste management*, 29: 1814-1818.
- Garmendia, L., Soto, M., Vicario, U., Kim, Y., Cajaraville, M. P., & Marigómez, I. (2011). Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the Prestige oil spill in Galicia and Bay of Biscay: tissue-level biomarkers and histopathology. *Journal of Environmental Monitoring*, 13: 915-932.
- GESAMP (2010, IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection) (2010). Proceedings of the GESAMP International Workshop on plastic particles as a vector in transporting persistent, bio-accumulating and toxic substances in the oceans. En T. Bowmer & P.J. Kershaw (Eds.), *GESAMP Reports and Studies* No. 82, 68 pp.
- Gosling, E. (2004). *Bivalve molluscs: biology, ecology and culture*. Oxford: Fishing News Books. 456 pp.
- Hartl, M.G.J., Gubbins, E., Gutierrez, T. & Fernandes, T.F. (2015), Review of existing knowledge – Emerging contaminants: Focus on nanomaterials and microplastics. *Scotland's centre of expertise for waters*. 21 pp.
- Hillman, R. E. (1993). Gonadal index and histopathology for the east and west coasts used in the national status and trends mussel watch project, 45–53 pp. En G. G. Lauenstein & A. Y. Cantillo (Eds.), *Sampling and analytical methods of the national status and trends program national benthic surveillance and mussel watch projects 1984–1992, Vol II. Comprehensive descriptions of complementary measurements*. Silver Spring, Maryland: NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 71. 118 pp.

- Izagirre, U. (2007). Contribution to the interpretation of lysosomal biomarkers in marine organisms based on the mechanistic understanding of the lysosomal responses to pollutants. *Eur. PhD Thesis, University of the Basque Country, Bilbao, Spain.*
- Löder, M. G., & Gerdt, G. (2015). Methodology used for the detection and identification of microplastics—A critical appraisal, 201-227 pp. En M. Bergmann, L. Gutow, & M. Klages (Eds.), *Marine Anthropogenic Litter*. Berlin: Springer International Publishing. 447 pp.
- Marigómez, I., & Baybay-Villacorta, L. (2003). Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. *Aquatic Toxicology*, *64*: 235-257.
- Moore, M. N. (1988). Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Marine Ecology - Progress Series*, *46*: 81-89.
- Moore M. N., Koehler A., Lowe D. & Viarengo A. (2008). Lysosomes and autophagy in aquatic animals, 581-620 pp. En D. J. Klionsky (Eds.), *Methods in enzymology* vol. 451. New York: Academic Press. 808 pp.
- Múgica, M., Sokolova, I. M., Izagirre, U., & Marigómez, I. (2015). Season-dependent effects of elevated temperature on stress biomarkers, energy metabolism and gamete development in mussels. *Marine Environmental Research*, *103*: 1-10.
- PlasticsEurope. 2015. Plastics - the Facts 2015. An analysis of European plastics production, demand and waste data. *PlasticsEurope*. www.plasticseurope.org/ Consultado el: 30 de Enero de 2016
- Terman, A., & Brunk, U. T. (2004). Lipofuscin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *36*: 1400-1404.
- Thompson, R. C. (2006). Plastic debris in the marine environment: consequences and solutions, 107–115 pp. En J.C. Krause, H. Nordheim, S. Bräger, (Eds.), *Marine Nature Conservation in Europe 2006* vol. 193. Stralsund, Germany: Federal Agency for Nature Conservation. 278 pp.
- Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., & Köhler, A. (2012). Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental Science & Technology*, *46*: 11327-11335.
- Wright, S. L., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environmental Pollution*, *178*: 483-492.
- Yavaşoğlu, A., Özkan, D., Güner, A., Katalay, S., Oltulu, F., & Yavaşoğlu, N. Ü. K. (2016). Histopathological and apoptotic changes on marine mussels *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) following exposure to environmental pollutants. *Marine Pollution Bulletin*. Disponible online en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X16304040> Consultado el: 25 de Junio de 2016
- Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Soto, M. & Cajaraville, M. P. (2006). Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. *Aquatic Toxicology*, *78*: S109 - S116