



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

*Evaluación de citotoxicidad de nanopartículas de polimetilmetacrilato-poliuretano (PMMA-PU) en células de adenocarcinoma de colon murino (HCT15)*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

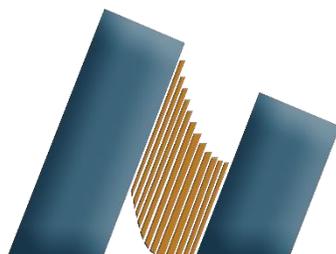
P R E S E N T A :

**Mauricio Castilla Pulido**

**TUTOR:**

**Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández**

Ensenada, Baja California, abril de 2022



Centro de Nanociencias y Nanotecnología - UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

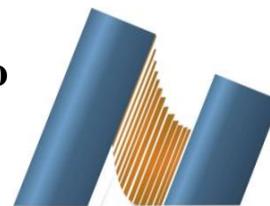
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Centro de Nanociencias y Nanotecnología**



---

**Licenciatura en Nanotecnología**

---

**Evaluación de citotoxicidad de nanopartículas de  
polimetilmetacrilato-poliuretano (PMMA-PU) en  
células de adenocarcinoma de colon murino  
(HCT15)**

TESIS

Para obtener el grado de

Licenciado en Nanotecnología

Presenta:

**Mauricio Castilla Pulido**

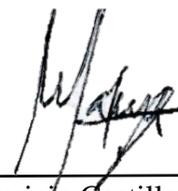
Directora de Tesis:

Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández

Ensenada, Baja California, México, abril 2022

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. Sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto a sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.



---

Mauricio Castilla Pulido

*Dedicado:*

*A mis padres*

*A mi abuela y tío*

*A mi hermana y hermano*

*Y a mi yo del pasado que lloraba diciendo: No puedo*

## Agradecimientos

A mi madre, que desde pequeño me impulsaba a seguir adelante creyendo en mí, empujándome a superarme para siempre lograr mis sueños y cumplir todas las metas que me proponga, siempre mostrándome todo su amor y cariño incondicional que me ha tenido.

A mi padre, quien, a pesar de su miedo por alejarme de ellos, siempre estaba al pie del cañón procurando darme lo mejor que tenía y dándome fuerzas para seguir adelante, aconsejándome por experiencia nueva que he vivido y alentándome a nunca rendirme a pesar de los tropiezos.

A mi hermano, que siempre me ha inspirado a ser una persona con mayor paciencia y marcar el camino para poder progresar como ser humano, siendo respetuoso y responsable ante los demás.

A mi hermana, que siempre me ha enseñado a ser una mejor persona y cuidar de los demás, dándome fuerzas para en un futuro yo poder ayudarla en su vida universitaria.

A mi tía y a mis primos de ensenada, por darme muchas tardes de diversión y salidas de entretenimiento, así como el asilo y el cariño que me dieron como familia.

A mi prima Mariana Rosas, por apoyarme incondicionalmente en estos cuatro años siendo mi apoyo emocional en días buenos y malos. Así como alentándome a seguir adelante. Cómo siempre se lo digo ¡Si se puede prima!

A mi generación (2017-2021) por mostrarme que la familia no es sólo aquella de sangre, si no aquella que te alienta a salir adelante, forma parte de tu vida universitaria, te muestra su cariño incondicional y siempre te hace crecer como persona. Gracias a todos que me enseñaron que todos somos especiales de algún modo y que nuestras cualidades individuales nos hicieron crecer como grupo y como profesionistas.

A Josh, Balam, Deyanira, Enrique, Diego, Rommel, Jaime y Patsy: amigos y hermanos que me han dado algunos de los mejores años de mi vida.

A Alejandra Mendieta, por su cariño, apoyo y por ser parte sumamente importante de mis años en el eje de Bionano.

A Tonalmi y Leticia, por ser siempre un apoyo mutuo en la superación de toda nuestra estadía en laboratorios.

A Daniel Vazquez, Daniela Molina y Melisa por ser parte de mis laboratorios de tesis y darme fuerzas para terminar mis experimentos sin importar la hora o el día.

A Ximena Barrera, mi mejor amiga que durante los cuatro años se encargó de hacerme sentir que siempre puedo, me ayudó a lograr mis objetivos, a distraerme y a estar ahí siempre que tenía mis bajones y mis momentos de emoción.

A la Dra. Ana Rodríguez que ha sido mi tutora y amiga, por todo el tiempo que me brindaba en laboratorio y fuera del el, así como los dulces, el conocimiento y la perfecta calidez humana que ha tenido conmigo.

Al comité que se tomó el tiempo para revisar mi trabajo dándome sugerencias y comentarios: Dr. Rafael Vázquez, Dr. Óscar Davis, Dra. Ana Bertha y Dr. Andrés Zarate.

A los técnicos de laboratorio, la Dra. Katrin Quester y la M.C. Itandehui Betanzo por su asistencia técnica y disposición en cuanto a materiales y equipos que se utilizaron en del desarrollo de este proyecto. Al Dr. Diego Delgado por su valioso tiempo y enseñanza para el tratamiento de imágenes en el microscopio confocal.

A la coordinadora Dra. Laura Viana, que independientemente del motivo, me abrió las puertas de la licenciatura. A sus asistentes, Laura Rosales y Laura Osuna por siempre ayudarme. A sus compañeros de oficina Paco y Raúl quienes me brindaron su amistad y los buenos momentos deportivos que pasamos.

A mis profesores de la carrera por servir de guía para consolidar mis conocimientos, por apasionarse por su materia y sobre todo por su tiempo

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la dicha de formar parte de la comunidad universitaria.

## Índice

<b>1. Introducción</b> .....	<b>9</b>
1.1 Plástico.....	9
1.2 Impacto del plástico en el planeta.....	11
1.3 Origen de los micro y nanoplásticos.....	12
1.4 Acumulación de micro y nanoplásticos en el ambiente.....	13
1.5 Ingesta de nanoplásticos.....	14
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>16</b>
<b>3. Marco teórico</b> .....	<b>17</b>
<b>4. Justificación</b> .....	<b>18</b>
<b>5. Objetivos</b> .....	<b>18</b>
<b>6. Hipótesis</b> .....	<b>19</b>
<b>7. Metodología</b> .....	<b>20</b>
7.1 Caracterización de nanopartículas.....	20
7.2. Ensayos de toxicidad in vitro.....	20
7.2.1. Línea celular.....	20
7.2.2 Mantenimiento de la línea celular HCT15.....	20
7.2.3 Viabilidad y Proliferación celular.....	21
7.2.4 Medición de proteína.....	22
7.2.5 Nitritos.....	23
7.2.5.1 Nitroprusiato de sodio.....	24
7.2.6 Apoptosis.....	24
7.2.6.1 <i>Naranja de Acridina</i> .....	25
7.3 Mito-ID® Red.....	25
Análisis estadístico.....	26
<b>8. Resultados</b> .....	<b>27</b>
8.1 Caracterización de nanopartículas.....	27
8.2 Ensayos de toxicidad in vitro.....	28
8.2.1 <i>Proliferación celular</i> .....	28
8.2.1.1 <i>Observación de los cultivos celulares por microscopia óptica</i> .....	31
8.2.2 Medición de proteína.....	32

8.2.3 Nitritos .....	33
8.2.3.1 Absorción de óxido nítrico por las NP's.....	34
8.2.4 Apoptosis .....	35
8.3 Mito-ID® Red.....	40
<b>9. Discusión.....</b>	<b>44</b>
<b>10. Conclusiones.....</b>	<b>48</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>49</b>
<b>Índice de figuras.....</b>	<b>54</b>

## 1. Introducción

### 1.1 Plástico

Actualmente, la globalización ha propiciado una falsa necesidad de consumo en la sociedad, llamada consumismo, lo que ha generado una cantidad inimaginable de productos que en su mayoría son desechables. La creación de este tipo de productos originó la búsqueda de materiales de fácil fabricación y de bajo costo de producción. Es así como los plásticos surgen formalmente con la síntesis de la baquelita en el año de 1907 por el químico Leo Beakeland (Solyman et al., 2017).

A partir de la creación de la baquelita, se generó un interés por este tipo de materiales y es en los años 50 que comienza su desarrollo exponencial con la síntesis de una gran cantidad de plásticos. Esto ha permitido que las grandes industrias comercialicen sus productos de manera masiva, sobre todo, aquellos fabricados a partir de procesos petroquímicos. Durante estos procesos se utiliza el petróleo crudo, así como el gas natural, que al pasarlos por refinerías dan productos como la nafta u otros aceites refinados, que son la materia prima para la producción de plásticos (US Department of Energy, 2019). Sin embargo, durante estos procesos se generan altos índices de contaminación ambiental, es decir, residuos tóxicos que terminan en el aire y el subsuelo (Substance Research Centers & Outreach Program, 2003).

Los procesos de síntesis se desarrollan de manera constante con nuevos materiales, pero el término “plástico” debe considerar las características establecidas por la organización *PlasticsEurope*, donde el plástico es un material orgánico polimérico, ya sea generado por el hombre o sintéticamente. Esto quiere decir que son cadenas de macromoléculas conformadas a partir de pequeñas moléculas (monómeros), dándole características de maleabilidad o plasticidad, lo que permite obtener diversas estructuras a nivel macromolecular que van desde pequeñas fibras, hasta grandes objetos como láminas (*PlasticsEurope*, 2010). Como se menciona, existe una gran cantidad de síntesis y usos de los plásticos; en 1988, la Sociedad de la Industria de Plásticos (SPI) creó una clasificación (tabla 1) para determinar la utilidad y la peligrosidad del material con base en la resina obtenida a partir de la materia prima (American Chemistry Council, 2016).

Esta clasificación permite la producción controlada de plásticos de acuerdo con su uso; en consecuencia, el plástico ha sustituido a otro tipo de materiales como el vidrio para botellas, o gomas como el caucho por termoplásticos de mayor resistencia (*Plastic Substitute: Alternative to Glass, Rubber, and Other Materials*, 2018).

**Tabla 1.** Clasificación de los plásticos según su contenido de resina.

Símbolo	Tipo de plástico	Propiedades	Usos comunes
 PET	Polietilentereftalato (PET)	Resistencia física, propiedades térmicas, ligereza, resistencia química. Inerte en alimentos. Se suaviza a 60 °C.	Botellas de agua, refrescos, envases para alimentos, cremas y productos farmacéuticos. Su reciclado debe ser con precaución o puede ser dañino para la salud.
 HDPE	Polietileno de alta densidad (HDPE)	Poco flexible, resistencia a químicos, opaco, fácil fabricación y manejo. Se suaviza a los 75 °C.	Bolsas para supermercado, cubetas, tapas, envases para leche, jugos, shampoo, químicos y detergentes.
 PVC	Policloruro de vinilo (PVC)	Duro, claro, flexible, elásticos, se puede utilizar con solventes. Se suaviza a 80 °C.	Tuberías, plomerías, mangueras, cables, correas de reloj, suelas de zapatos, envases en general. Dañino para la salud por su proceso de fabricación.
 LDPE	Polietileno de baja densidad (LDPE)	Suave, flexible, translucido, se raya fácilmente. Se suaviza a 70 °C.	Películas para empaque, bolsas de basura, envases para laboratorio.
 PP	Polipropileno (PP)	Poco flexible, translucido, versátil, soporta solventes. Se suaviza a 140 °C.	Popotes, equipo de jardinería, cintas para empacar, bolsas para frituras, cajas para alimentos, envases para uso veterinario y farmacéutico.
 PS	Poliestireno (PS)	Claro, opaco, rígido, frágil, se corroe con grasas y solventes. Se suaviza a 95 °C.	Juguetes. cubiertas de plástico, imitaciones de cristal, cajas para discos compactos, envases para cosméticos. Dañino para la salud por su proceso de fabricación.
 PS-E	Poliestireno extendido (PS-E)	Esponjoso, ligero, absorbe energía, ayuda a mantener temperaturas.	Tasas para altas temperaturas, charolas para comida para llevar, envases de hielo seco, empaque protector de mercancía frágil.
 OTHER	Otros (SAN, ABS, PC, Nylon)	Otras resinas y combinación de ellas. Sus propiedades dependen de la combinación de las resinas.	Hieleras, electrónicos, autopartes, piezas para empaques. Su reciclado debe ser con precaución o puede ser dañino para la salud.

Esta clasificación precisa cuál o cuáles plásticos son nocivos para la salud pública; en este caso, el PVC (Policloruro de vinilo), PS (Poliestireno) y Otros son los que debemos evitar, ya que al ser expuestos al calor generan subproductos tóxicos; incluso, el PET (tereftalato de polietileno) produce subproductos tóxicos en procesos como la pirólisis, que es la exposición del plástico a altas temperaturas (Honus et al., 2018). Debido a esto, es de suma importancia que se reduzca la producción y consumo de plásticos, así como buscar mecanismos de reciclaje para evitar una mayor contaminación por desperdicio y reducir la cantidad de plásticos existentes en el medio ambiente.

### *1.2 Impacto del plástico en el planeta*

El desarrollo de los procesos de fabricación de los plásticos ha permitido una producción masiva a bajos costos, por lo que se ha generado una inmensa cantidad de productos de un solo uso, causando una acumulación impresionante de basura y desperdicios plásticos (Lindwall, 2020). Tan solo en 2012 se produjeron 280 millones de toneladas de plástico a nivel mundial, de las cuales 150 millones se desecharon y causaron contaminación por acumulación (Browne, 2013). Por ejemplo, la unión europea hasta 2017 utilizaba entre el 4 y 6 % del petróleo y gas para la producción de polímeros sintéticos, lo cual supone la producción de 61.8 millones de toneladas de plástico. Sin embargo de toda esa producción, solo 9.4 millones de toneladas fueron recicladas, es decir, solo un 15.2 % (European-Plastics, 2015). En el caso de México, durante el año 2018 el mercado del plástico rondaba los 41.46 mil millones de dólares, y como consecuencia se produjeron aproximadamente 4.3 millones de toneladas de plástico. De todos los tipos de plásticos producidos, entre los de mayor volumen de producción estaban el PET, PVC y PE; sin embargo de todo ese volumen sólo el 10 % fue reciclado (Tetakawi, 2020).

Desafortunadamente, el resto de plásticos, termina desechándose en forma de basura, la cual se acumula en basureros locales o ecosistemas aledaños a las ciudades donde se consumen y producen (Zubris & Richards, 2005). Asimismo, debido a las condiciones ambientales como los vientos y lluvias, los plásticos pueden terminar en los mantos acuíferos, ríos y lagos (Barnes et al., 2009; Browne et al., 2011). La misma corriente de estos sistemas propicia la llegada de estos desperdicios al mar (figura 1A), donde la excesiva acumulación ha generado islas flotantes de basura (Eriksen et al., 2014). Esto también ha provocado que la flora y la fauna de los ecosistemas se vean afectadas por el constante contacto con estos plásticos contaminantes causando daños importantes. Además, se ha visto que estos pueden causar alteraciones en la salud de la fauna como es el caso de las gaviotas, que mantienen contacto constante con plásticos (figura 1B) (Browne, 2013).



**Figura 1.** A) Acumulación de restos de plástico en Barahona, República Dominicana (Fotos por JF) (Rey et al., 2021). B) Cigüeña blanca enredada en una bolsa de plástico (foto por Jhon Cancalos de Natre).

Actualmente, estas acumulaciones e interacciones del material plástico en los ecosistemas se ha convertido en un problema que requiere mayor atención, ya que se conoce que el plástico puede tardar hasta 500 años en degradarse (*The Lifecycle of Plastics – WWF-Australia - WWF-Australia*, n.d.). Sin embargo, el plástico, a pesar de ser considerado un material resistente puede ser susceptible a la transformación, causada por ambientes dinámicos, por ejemplo, el mar (Rey et al., 2021). Estos factores pueden erosionar la superficie del plástico, lo cual crea partículas de menor tamaño, como es el caso de los micro y nanoplásticos.

### *1.3 Origen de los micro y nanoplásticos*

Por lo regular, la interacción del medio ambiente genera las micro y nanopartículas de estos plásticos. Adicionalmente, dentro de los procesos de producción existen residuos químicos que llegan también a la formación de estas partículas. Por ello, los micro y nanoplásticos se dividen en dos orígenes, primario y secundario. Los primarios se originan por procesos de degradación intencional para uso en productos cotidianos, es decir, de manera sintética. Por otro lado, los secundarios son el resultado de la degradación de plásticos a macroescala que, por procesos naturales como abrasión del viento, las olas del mar y la radiación UV del sol, crean las micro y nanopartículas (Rogers, 2020).

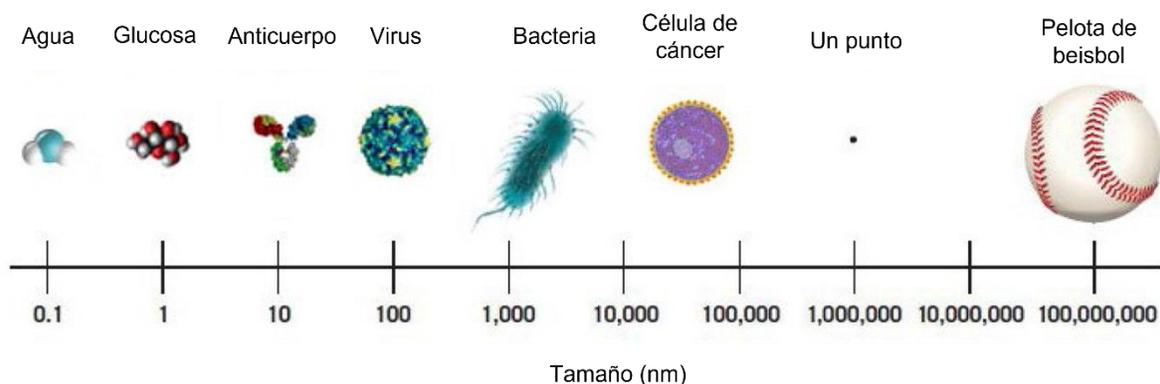
En el caso del origen primario, durante los procesos de refinación del petróleo se obtienen residuos de cadenas de carbono grandes, que mediante procesos térmicos y de descomposición catalítica, se busca la reducción de cadenas para formar micro y nanopartículas plásticas (Kasar et al., 2020). En este caso, la pirólisis cumple la función principal de degradación, este es un proceso termoquímico donde en ausencia de oxígeno se

somete un material orgánico a altas temperaturas para romper los enlaces químicos del material y así poder formar cadenas más pequeñas (Eastern Regional Research Center, 2020).

Para el origen secundario, existen procesos fotocatalíticos naturales que generan la degradación de los plásticos a micropartículas (Ana G. Rodríguez-Hernández et al., 2019). Una vez los plásticos entran en contacto con medios como el mar, la fricción constante de los plásticos con elementos abrasivos como la arena, residuos de coral y el agua, desgastan el material como efecto de una lija, y al tener incidencia constante de la luz solar, se forman las partículas en una escala micro y nano (Uheida et al., 2021).

#### 1.4 Acumulación de micro y nanoplásticos en el ambiente

Sin importar cual sea su origen, los microplásticos y nanoplásticos causan una constante preocupación entre la comunidad científica y el mundo. Esto debido a que, similar a cualquier otro material, estas partículas plásticas incrementan su reactividad, a causa del aumento en el área superficial, convirtiéndolos en partículas tóxicas para cualquier especie (Ana G. Rodríguez-Hernández et al., 2019). No obstante, aún está el debate sobre el tamaño de partícula y la denominación de microplástico o nanoplástico. Lo primero a considerar para diferenciarlos es tomar en cuenta que un nanómetro equivale a  $1 \times 10^{-9}$  m y un micrómetro equivale a  $1 \times 10^{-6}$  m, donde existen tres órdenes de magnitud de diferencia entre estas subunidades. Para comprender mejor la dimensión de 1 nm, en la figura 2 se observa una comparación de tamaños entre distintos elementos con un tamaño en escala nanométrica.



**Figura 2.** Comparación de tamaños de diferentes elementos en la escala nanométrica (Zhu, 2019).

Por otro lado, se han realizado una gran cantidad de caracterizaciones de las partículas de plástico encontradas en el ambiente y producidas de manera sintética, para lo cual se ha generado una clasificación de acuerdo con las siguientes características: se considera un nanoplástico a aquellas partículas que su diámetro promedio o al menos una de sus dimensiones sea menor a 100 nm; por otra parte, las partículas con dimensiones mayores a

100 nm y menores a 1 mm son consideradas microplásticos (Chae & An, 2017; Sobhani et al., 2020)

Ahora bien, en los últimos años los micro y nanoplásticos han sido observados en playas y zonas costeras de países como Brasil (Barcellos Da Costa et al., 2021), Hawái (Rey et al., 2021), Estados Unidos (Rosevelt et al., 2013), Suiza, entre otros (Bellasi et al., 2021). De igual manera, se ha observado la acumulación de micro y nanoplásticos en plantas de tratamiento de aguas residuales, lo que significa que estamos en contacto directo con estas partículas (Simon et al., 2018). Incluso se han encontrado micropartículas plásticas en productos de cuidados personal cómo cremas, protectores solares, jabón líquido y champú (Hernandez et al., 2017; Sun et al., 2020). Esto es una advertencia alarmante que debemos regular el uso de plásticos en cualquier tipo de producto, ya que aún no conocemos las consecuencias de estas partículas al estar en contacto directo con la piel o incluso en caso de que se lleguen a ingerir por la especie humana.

### 1.5 Ingesta de nanoplásticos

La presencia de estos nanoplásticos en el ambiente, así como en productos de uso diario puede significar una forma para la ingestión de estas por el humano. Se ha observado que diferentes especies de algas marinas presentaron una bioacumulación de los micro y nanoplásticos (Harris et al., 2021). Cómo se sabe, el alga sirve de alimento para especies de mayor tamaño, desde peces pequeños hasta las ballenas, por ello, este tipo de especies que consumen algas o microalgas, han sido estudiadas demostrando que existe una bioacumulación en los órganos digestivos de especies como los *Pomatoschistus microps* (gobio común), *Carcinus maenas* (cangrejo común) y *Melanotaenia fluviatilis* (pez arcoíris) (Chae & An, 2017).

Esto demuestra que los nanoplásticos pueden entrar a la cadena trófica por varias rutas, una de ellas involucra a microorganismos como protozoarios, fitoplancton o zooplancton que son la base de la cadena alimenticia. Una vez internalizados por estos organismos, los nanoplásticos pueden ser transmitidos a otros organismos, de la cadena trófica lo que permite a las partículas circular por los sistemas digestivos de los seres vivos que las ingieren, donde pueden ser digeridos o simplemente bioacumulados (Ma et al., 2016) y pasar de una especie a otra.

Con esto dicho, estas partículas no sólo se han encontrado en especies marinas, sino también en cultivos de tomate (Hernández-Arenas et al., 2021) e incluso presentes en productos como la leche, la cerveza y la miel (Diaz-Basantes et al., 2020). Esto supone un riesgo muy alto para la ingestión humana, donde estudios realizados en distintas especies se ha relacionado con alteraciones funcionales y estructurales, evidencia de la bioacumulación en tracto digestivo en especies como *Mytilus edulis* (mejillón) y *Crassostrea virginica* (ostión), infertilidad en *Tigriopus japonicus* (copépodo) y apoptosis celular de especies como

*Mytilus galloprovincialis* (mejillón mediterráneo) (da Costa et al., 2016). Existen estudios donde se compara los efectos en diferentes especies de mamíferos, donde se concluye que hasta este momento se tiene poco conocimiento sobre las afectaciones de los micro y nanoplásticos y que se requiere mayor investigación en mecanismos a nivel celular y tisular (Yong et al., 2020).

De igual manera, se están desarrollando estudios en líneas celulares de colon que permiten dar un acercamiento a las consecuencias de la ingestión de las partículas por humanos (Hirt & Body-Malapel, 2020). Por otro lado, además del intestino, recientemente se han encontrado microplásticos en heces humanas (Chae & An, 2017; Hirt & Body-Malapel, 2020) y en la placenta humana; en este último se encontraron partículas de polipropileno pigmentado en un rango de 5 a 10  $\mu\text{m}$ , que pueden estar relacionado a pinturas, adhesivos e incluso productos cosméticos y de higiene personal (Ragusa et al., 2021). No obstante, la mayoría de estos estudios se han centrado en la presencia de micropartículas de plástico, mientras que las nanopartículas han sido poco estudiadas. Por esta razón, es importante analizar los efectos obtenidos por partículas en la escala nano, sabiendo que las características físicas, químicas y de superficie variarán de acuerdo con el tamaño de partícula.

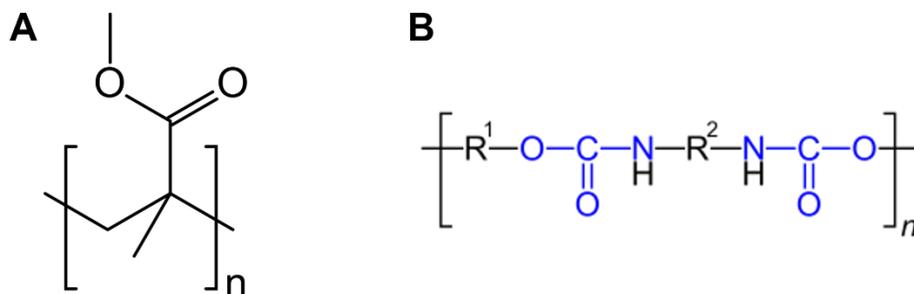
## 2. Antecedentes

El aislamiento, identificación y determinación de las concentraciones de micro y nanoplásticos presentes en el ambiente es un tema de investigación actual. Aunque se han reportado trabajos de extracción de micro y nanoplásticos del medio ambiente (Horton et al., 2017), una de las estrategias utilizadas es la fabricación por síntesis de nanopartículas para su estudio en modelos *in vitro* (Kokalj et al., 2021). Para estas síntesis, se requieren de procesos de polimerización de la materia prima, es decir de la formación de cadenas nuevas a partir de la materia prima utilizada. La polimerización es un proceso químico que se puede dar de dos formas, por reacción en cadena y por reacción en etapas, también conocidas como polimerización por adición y por condensación respectivamente. Estos procesos son la creación de cadenas largas de compuestos a partir de moléculas llamadas monómeros (Edmondson & Gilbert, 2017).

Existen algunos trabajos al respecto como el Rodríguez-Hernández y colaboradores (2019) donde sintetizaron nanopartículas de PET con un radio hidrodinámico de entre 50 a 100 nm, por medio de disolución de partículas de PET en ácido trifluoroacético y reprecipitación por adición de soluciones acuosas del mismo solvente (Rodríguez-Hernández et al., 2019). De igual manera, Yufen y colaboradores (2017) sintetizaron compositos de polimetilmetacrilato-poliuretano (PMMA-PU) con un diámetro hidrodinámico de 1 a 5  $\mu\text{m}$  usando la técnica de reacción inducida por separación de fases (Zhang et al., 2017).

### *Nuevas fuentes de nanoplásticos*

Este último (PMMA-PU) es una combinación de plásticos utilizados comúnmente para la fabricación de elementos por medio de extrusión y altas temperaturas. Este material transparente forma una estructura de fases, es decir por capas, donde la fase continua es mayormente formada por PU (figura 3a) y la fase dispersa mayormente por PMMA (figura 3b). Esta interacción está mediada por un enlace de hidrógeno presentado entre el PMMA y el PU, lo cual ayuda a que se llegue a temperaturas de transición de hasta 120°C (Patrício et al., 2006). Ambos plásticos presentan valores altos de deformación inelástica, donde en la escala nano, a medida que aumenta la temperatura esta deformación se vuelve pronunciada, y permite una polimerización a temperatura ambiente y por exposición directa al sol (Jancar et al., 2013). Estas características dan paso a su uso en nuevas tecnologías, tal como el caso de la impresión 3D, donde se utilizan polímeros de PMMA-PU para realizar las impresiones (Rohringer, 2021).



**Figura 3.** Estructura química del polímero A) polimetilmetacrilato y B) poliuretano.

No obstante, el uso de estas impresoras genera una gran cantidad de residuos, de los cuales la mayoría terminan siendo desechados (Toor, 2019). Estudios demuestran que los residuos son almacenados en contenedores con etanol, y en combinación con la luz del sol, se crean partículas en la escala nano, ya sea de compuestos como poliuretano-poliacrilato (PU-PA) (Rodríguez-Hernández et al., 2020) o de partículas de PMMA-PU (Zhang et al., 2017). Estas nanopartículas pueden aglomerarse hasta llegar a 1 mm de radio hidrodinámico, pero al dispersarse pueden llegar a los 300 nm, implicando un riesgo ambiental y para la salud pública al llegar a la cadena trófica (Rodríguez-Hernández et al., 2020), por ello, es importante realizar los estudios correspondientes respecto a las consecuencias asociadas a este tipo de plásticos.

### 3. Marco teórico

Cómo se menciona anteriormente, estas características de polimerización le permiten al PMMA-PU convertirse en nanopartículas en condiciones de temperatura ambiente y exposición solar. Esto se observa por un proceso de emulsión de las monómeros del plástico, que en contacto con el sol por un periodo aproximado de 5 minutos, comienza a generar las pequeñas micelas del material, formando así las nanopartículas (Rodríguez-Hernández et al., 2020).

Por otro lado, se han realizado estudios de internalización para identificar los posibles efectos citotóxicos de NP's de PMMA-PU en líneas celulares humanas como el BHK-21 (Mahadevan & Valiyaveetil, 2021), y HCT15 (Rodríguez-Hernández et al., 2020) así como Raw 264.7 con nanopartículas de PET, para identificar los posibles efectos citotóxicos de estos compuestos. En el caso del estudio de Raw 264.7 se observó una alteración en la producción de ROS, alterando el ciclo de proliferación celular (Aguilar-Guzmán et al., 2022). Además, existen estudios de internalización de nanoplásticos de PS en macrófagos, para observar las afectaciones a la línea celular. En estos trabajos se concluyó que el tamaño de partícula es fundamental en la internalización y se conoce un mecanismo de endocitosis por diferentes vías, dependiendo del tipo de partículas de PS estudiada (PS50, PS500 y PS5000) (Liu et al., 2021).

La bioacumulación regularmente se observa en órganos como el intestino, el riñón, el hígado y en ocasiones en los pulmones y el corazón, por ello, es importante estudiar líneas celulares asociadas a estos órganos, para desvelar los mecanismos de internalización y la reacción y efectos directos sobre las células en ensayos *in vitro* (Yong et al., 2020). Una de las líneas ampliamente utilizada para estos estudios, conocidos como estudios citotóxicos, es la línea de adenocarcinoma colorrectal, específicamente la línea HCT15 (Guo et al., 2016). Esta línea celular, presenta una morfología y fisiología muy similar a las células sanas, presentando una reproducibilidad en los ensayos. Por ello, se espera obtener un análisis de los efectos que presenta la línea celular HCT15 en presencia de nanopartículas de PMMA-PU extraídas a partir de residuos obtenidos de impresoras 3D.

#### **4. Justificación**

La contaminación ambiental por plásticos, su ubicuidad y la alta exposición que tiene el ser humano a estos, ha aumentado de manera exponencial en los últimos años, lo que causa una preocupación constante en la población. Aunado a esto, recientemente se ha reportado una nueva fuente de nanoplasticos provenientes de los desechos generados por impresoras 3D, que debido a un manejo inadecuado y su fácil dispersión en el agua pone sobre la mesa el riesgo de su incorporación a la cadena alimenticia y, por ende, un alto riesgo de ser ingerido por el ser humano. Por lo anterior, es necesario conocer los efectos que puedan ocasionar los nanoplasticos a nivel celular en estudios *in vitro* para encontrar alteraciones celulares específicas que sirvan de modelo para posteriores estudios *in vivo*. Por lo tanto, en el presente trabajo se realizará un estudio *in vitro* de citotoxicidad de las nanopartículas (NP's) de polimetilmetacrilato-poliuretano (PMMA-PU) con la línea celular HCT15, para determinar las concentraciones a las cuales existe una alteración de sus funciones celulares. Este modelo celular presenta características funcionales similares a la célula que conforma una barrera epitelial intestinal.

#### **5. Objetivos**

##### *Objetivo General*

- Estudiar los efectos citotóxicos de las partículas de PMMA-PU sobre la línea celular HCT15.

##### *Objetivos Específicos*

- Analizar los efectos de las nanopartículas de PMMA-PU en la viabilidad y proliferación celular de la línea celular HCT15.
- Determinar la concentración crítica de nanopartículas de PMMA-PU que afecta la viabilidad de la línea celular HCT15 en ensayos *in vitro*.
- Estudiar la relación que existe entre la viabilidad celular y la biomasa celular.

- Analizar el efecto en la liberación de nitritos de las células HCT15 en presencia de las nanopartículas PMMA.
- Estudiar el daño a las células por medio del marcaje y la identificación de las mitocondrias por medio de microscopía confocal.

## **6. Hipótesis**

La línea celular de adenocarcinoma de colon (HCT15) tendrá una respuesta citotóxica por la interacción con nanopartículas de polimetilmetacrilato-poliuretano (PMMA-PU), alterando su morfología y sus funciones celulares.

## **7. Metodología**

### *7.1 Caracterización de nanopartículas*

Las partículas utilizadas fueron un copolímero PMMA-PU producido por un proceso de polimerización por emulsificación (resina/etanol), donde la polimerización se da por exposición a radiación ultravioleta (Rodríguez-Hernández et al., 2020). Las nanopartículas fueron obtenidas a partir de residuos de impresión 3D. Para su caracterización se suspendieron las partículas en etanol al 99% y se homogenizó, se extrajeron 100  $\mu\text{L}$  y se añadió a 900  $\mu\text{L}$  de PBS previamente colocados en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se ultrasonizó la muestra por 1 minuto y se extrajo 1 mL de muestra para colocar sobre una celda desechable con capilares (Malvern) para su posterior caracterización por dispersión dinámica de luz (DLS) (Malvern Zetasizer Nano). Se realizó la misma medición para una muestra suspendida en DMEM suplementado.

### *7.2. Ensayos de toxicidad in vitro*

#### *7.2.1. Línea celular*

La línea celular HCT15 (ATCC, 2021) proviene del aislamiento del intestino grueso de un paciente varón con cáncer colorrectal (Dukes C), la cual tiene una morfología epitelial y un crecimiento adherente. Para el mantenimiento y los experimentos de citotoxicidad con la línea celular HCT15, se utilizó el medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma Aldrich), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Mayimex) y antibiótico-antimicótico (anti-anti) al 1% (Sigma Aldrich). El mantenimiento y los correspondientes ensayos con la línea celular se llevaron a cabo siguiendo la guía de mantenimiento de cultivo celular de Thermo Fisher Scientific (Guidelines for Maintaining Cultured Cells).

#### *7.2.2 Mantenimiento de la línea celular HCT15*

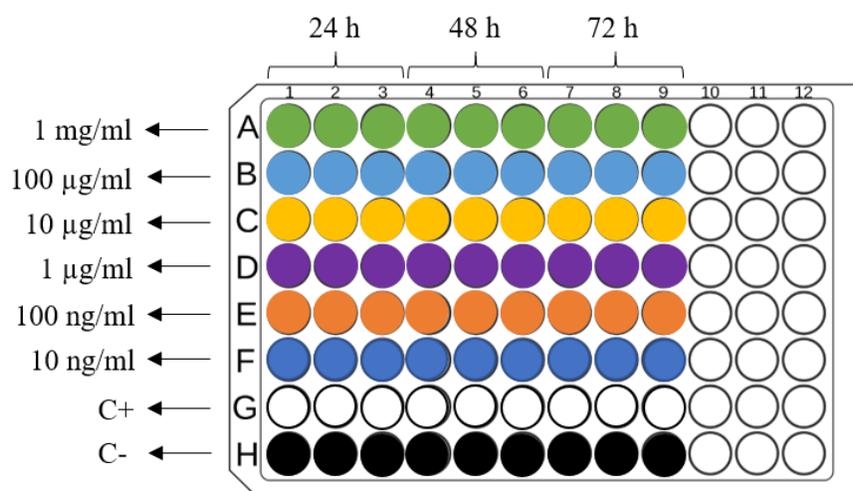
El primer paso fue descongelar la línea celular, la cual se encontraba en tubos de criopreservación. Se descongeló el criotubo a temperatura ambiente y rápidamente se vertió el contenido en un tubo Falcon™ de 15 mL previamente llenado con 2 mL de medio de cultivo y 2 mL de PBS 1X (pH 7.4). Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el medio de criopreservación y se añadieron 6 mL de medio de cultivo DMEM suplementado, se homogenizó y la suspensión se colocó en una placa de cultivo de 6 cm de diámetro y se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta el 80% de confluencia para poder llevar a cabo los ensayos con las nanopartículas

Una vez alcanzada la cantidad necesaria de células, se retiró el medio, se lavaron las células con 5 mL de PBS 1X y se despegaron de la superficie de la placa Petri con 0.5 mL de tripsina+EDTA (Sigma Aldrich) y se incubaron por 3 minutos a 37°C. Posteriormente, se

agregó 0,5 mL de medio completo y se centrifugaron en un tubo Eppendorf™ a 1250 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadió 1 mL de DMEM suplementado nuevo. Posterior a ello, se contó el número de células mediante el uso de la cámara de Neubauer y se determinó que los ensayos subsecuentes se realizaran con un total de 10,000 células por pozo.

### 7.2.3 Viabilidad y Proliferación celular

La línea celular HCT15 es muy utilizada en estudios *in vitro* en 2 y 3 dimensiones (ATCC, 2021). Su fisiología de célula epitelial permite observar los cambios conformacionales al estar en contacto con agentes externos que alteren la estabilidad de su estructura o causen daños a nivel génico (Singh Yadav et al., 2019). Por ello, se realizó la evaluación de proliferación celular de la línea HCT15 mediante un ensayo colorimétrico utilizando el reactivo AlamarBlue® (Sigma Aldrich). Para esto, se colocaron diferentes concentraciones (1 mg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 100 ng/mL y 10 ng/mL), además de un control positivo (células sin estímulo) y uno negativo de viabilidad (DMSO 10%) en una placa de 96 pozos. Se colocaron las siguientes pruebas: para las filas de pozos de la A a la F se colocaron 170 µL de medio DMEM más 10 µL de medio con células (10 000 células) más 20 µL de medio con la concentración correspondiente de PMMA-PU. Para el control positivo se añadieron 190 µL de medio DMEM más 10 µL de medio con células y para el control negativo se añadieron 170 µL de medio DMEM más 10 µL de medio con células más 20 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) como se observa en la figura 4. En todos los casos el volumen final fue de 200 µL. Los tratamientos fueron incubados durante 7 días a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y se realizaron mediciones cada 24 horas.



**Figura 4.** Representación gráfica del ordenamiento del ensayo de proliferación (el volumen final de todas las muestras fue de 200 µL).

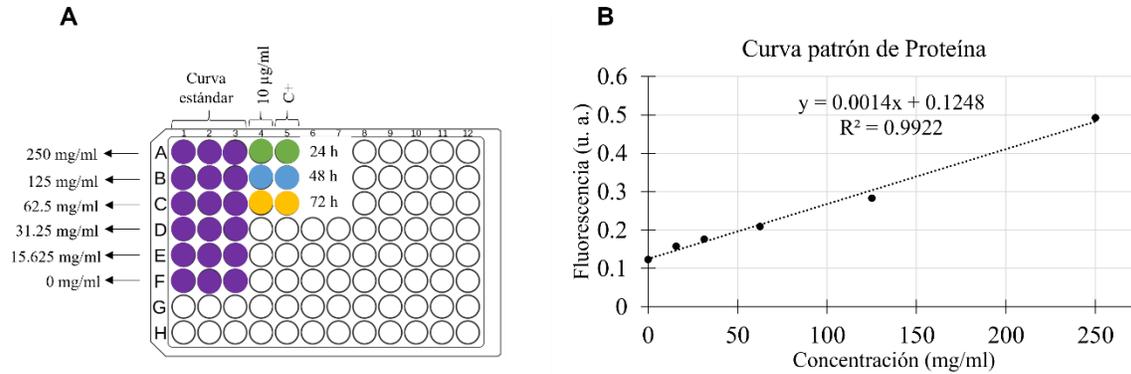
Posteriormente, pasados los correspondientes tiempos de incubación se depositaron 20  $\mu$ L del reactivo AlamarBlue<sup>®</sup> (10% v/v) a todas las muestras y se volvieron a incubar a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Pasadas 4 horas se tomó el sobrenadante de las muestras y se depositó en una nueva placa de 96 pozos para determinar su fluorescencia a una longitud de onda de 560/590 nm de excitación/emisión con un espectrofluorímetro (Cary Eclipse, Agilent) para determinar la reducción del compuesto resazurina. Se repitió el mismo proceso para cada uno de los siete días.

Para tener un registro visual de los cambios morfológicos de las células, después de cada medida se tomaron fotografías por medio del microscopio de fluorescencia (Olympus BX51). Este registro se realizó únicamente durante los primeros tres días, ya que, en algunos casos, la cantidad de células impidió una correcta visualización.

#### *7.2.4 Medición de proteína*

Por medio de técnicas colorimétricas como el MTT o la resazurina (indicadores indirectos de viabilidad), en ocasiones se puede realizar un seguimiento en el tiempo de proliferación celular como en este caso de la línea celular HCT15, no obstante, una técnica para medir el incremento en la biomasa es por medio de la cuantificación de la proteína. Para realizar este ensayo se requirió recuperar las células de los primeros tres días del ensayo anterior, con la concentración de 10  $\mu$ g/mL y el control positivo. Se comenzó por despegar las células mecánicamente de los pozos, con ayuda de un gendarme. Posteriormente, las células fueron recolectadas y resuspendidas vigorosamente en un tubo Eppendorf<sup>™</sup> de 1.5 mL y centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante, se añadieron 100  $\mu$ L de PBS 1X pH 7.4 y se resuspendió por medio de vortex y finalmente, las muestras se almacenaron a -20°C, hasta la realización del ensayo. Una vez realizado el procedimiento anterior para cada día, todas las muestras se ultrasonicaron (Vibra Cell<sup>™</sup> VCX 600, Sonics & Materials Inc) con una amplitud de 25% por 2 minutos con intervalos de 10 segundos de sonificado por 10 segundos de descanso, para la ruptura total de las células

Para realizar la cuantificación de proteína, se utilizó el kit de proteína Pierce<sup>™</sup> BCA (ThermoFisher), y una placa de 96 pozos para colocar las muestras y la curva patrón, cómo se observa en la figura 5A. Se colocaron 25  $\mu$ L de la solución de células y 25  $\mu$ L de diferentes concentraciones (250 mg/mL, 125 mg/mL, 62.5 mg/mL, 31.25 mg/mL, 15.625 mg/mL y 0 mg/mL) de la solución estándar de albumina de suero bovino (BSA) para realizar la curva patrón. Se añadieron 100  $\mu$ L del agente de trabajo ácido bicinconínico: (BCA) a una concentración de 50 partes de agente A por 1 de agente B, y se resuspendió delicadamente para permitir la homogeneidad de la solución. Se incubó a 37°C por 30 minutos y se midió la absorbancia a 560 nm (Multiskan GO), se tomó como blanco PBS 1X. Por último, se realizó la curva patrón (figura 5B) y se obtuvo la concentración de proteína por día de ensayo.



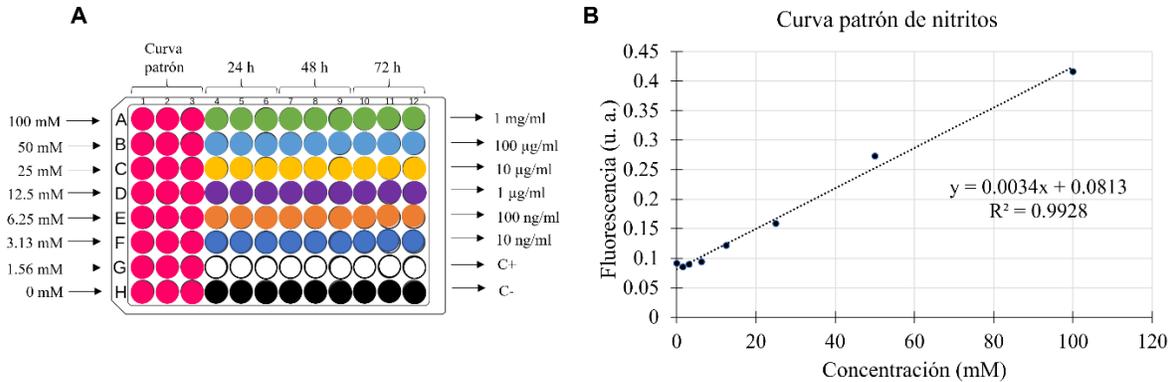
**Figura 5.** A) Representación gráfica del ordenamiento del ensayo de proteína y B) la curva patrón correspondiente.

### 7.2.5 Nitritos

Es importante considerar que existe una respuesta de estas células al agente extraño al que se somete durante los ensayos, que en este caso son nuestros nanoplásticos. Un parámetro importante que ayuda a analizar esta respuesta es la medición de nitritos. Estos son compuestos importantes para el metabolismo de nutrientes, como sucede en el intestino, en el cual se genera una absorción de nutrientes por medio de células epiteliales aportando nitritos y nitratos al sistema (Jobgen et al., 2007). Por lo tanto, es importante cuantificar los nitritos en el medio de cultivo en presencia y ausencia de nanopartículas de PMMA-PU. Para ello, se determinó la concentración de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) que se deriva de dos productos de la transformación de óxido de nitrógeno. Se utilizó una placa de 96 pozos donde se colocaron 10,000 células por triplicado para cada condición a evaluar (1 mg/mL, 100  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$ , 100 ng/mL y 10 ng/mL), además de un control positivo (células sin estímulo) y uno negativo (DMSO 10%) en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  por pozo.

El ensayo se realizó por un periodo de tres días y por triplicado. Transcurridas las primeras 24 horas, las células se sometieron las muestras a una prueba con el agente Griess (Sigma Aldrich), para lograr determinar la concentración de nitritos por la absorbancia obtenida en el sobrenadante de la muestra. El reactivo Griess se preparó disolviendo 10 g de Griess en polvo en una solución de 25 mL de agua destilada. Posteriormente, se extrajeron 50  $\mu\text{L}$  de cada pozo, se colocaron sobre una nueva placa y se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de reactivo de Griess (figura 6A). Las muestras, se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Por último, se midió la absorbancia a 540 nm. Se realizó el mismo proceso a las 48 y 72 horas.

De igual manera, se realizó una curva patrón por triplicado (figura 6B) para obtener la correlación de la absorbancia y determinar la concentración correspondiente de nitritos en cada una de las muestras analizadas. Se tomó en cuenta que, la concentración de nitritos es directamente proporcional a la generación de óxido nítrico.



**Figura 6.** A) Representación gráfica del ordenamiento del ensayo de nitritos y B) la curva patrón correspondiente.

### 7.2.5.1 Nitroprusiato de sodio

El nitroprusiato de sodio es un vasodilatador arteriovenoso. Por su potente acción vasodilatadora, produce una disminución de la resistencia vascular periférica y un marcado descenso de la presión arterial. Al igual que los nitratos, actúa como un donador de óxido nítrico (Hottinger et al., 2014). Por otro lado, se sabe que las nanopartículas pueden adsorber fácilmente moléculas disueltas en el medio, por lo que se analizó la adsorción de nitroprusiato de sodio por nanopartículas de PMMA-PU. Para analizar esto, se preparó una solución stock de nitroprusiato de sodio de 20 mg/mL, de donde se extrajeron 50  $\mu$ L para preparar una solución madre de 1 mg/mL diluido en PBS 1X (pH 7.4). De la solución madre, se extrajeron 50  $\mu$ L y se añadió a la solución de PBS 1X con 1 mg/mL de NP's de PMMA-PU. Se incubó a 30 °C en agitación constante (200 rpm). Para determinar la disminución del nitroprusiato de sodio en el medio, se realizó una medición de absorbancia desde el tiempo 0 y cada 24 horas por un periodo de siete días en el espectrofotómetro (Multiskan GO) a una longitud de onda de 395 nm en una celda capilar.

### 7.2.6 Apoptosis

Con la obtención de la cantidad de nitritos existentes en el cultivo con estímulo, se puede relacionar si existe o no un proceso de muerte celular ocasionado por la presencia de las nanopartículas. Uno de los mecanismos a los que puede tender la línea celular por la liberación de nitritos es la apoptosis o muerte celular programadas (Fu et al., 2015). Para determinar si este mecanismo está presentándose en las células HCT15, se recurrió al procedimiento de tinción por naranja de acridina. Este método, permite analizar visual y experimentalmente la muestra y determinar a través de un cambio de color en la tinción por medio de fluorescencia, la muerte celular y la viabilidad existente en la muestra.

### 7.2.6.1 Naranja de Acridina

Primero, se preparó la solución madre disolviendo 5 mg de naranja de acridina (Sigma Aldrich) en 1 mL de agua destilada y se almacenó a 4 °C. Posteriormente, se preparó la solución de trabajo extrayendo 0.1 mL de solución madre y añadiendo 5 mL de agua destilada con 0.05 mL de ácido acético glacial.

Para el ensayo, se utilizó una placa de 12 pozos donde se colocó un volumen de 2 mL por pozo. Se añadió una cantidad de 200  $\mu$ L de concentración de PMMA-PU (10  $\mu$ g/mL y 1  $\mu$ g/mL) y 30,000 células en DMEM suplementado. En el control positivo se añadieron las 30,000 células con el medio DMEM y, para el control negativo se añadieron 30,000 células con medio DMEM y 200  $\mu$ L de DMSO (10% v/v). Una vez montado el ensayo, se incubó a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Pasados los correspondientes tiempos de incubación se depositaron 200  $\mu$ L de la solución de trabajo y se dejó incubar a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> por 30 minutos. Este proceso se repitió para cada día de incubación. Por último, se observaron las muestras en el microscopio de fluorescencia (LS720, Etaluma, filtros rojo y verde con ex/em de 580-598/612-680 nm y 473-491/502-561 nm respectivamente) a una magnificación de 20x.

### 7.3 Mito-ID® Red

Por último, otro parámetro para determinar el daño celular se realizó observando la integridad de las mitocondrias por medio de una tinción específica para estos organelos, con la finalidad de observar si existe un daño parcial o permanente en el número de mitocondrias y su estructura física, que puede significar un daño a nivel celular. Esta tinción permite observar a las mitocondrias presentes en las células, para ello, se montó un ensayo de tres días con la concentración de 10  $\mu$ g/mL de PMMA-PU. Se utilizó una placa de 12 pozos con cubreobjetos previamente esterilizados, uno para el control positivo, y otro para la muestra con NP's. Primero, se colocó poly-L-lisina sobre el cubreobjetos cubriéndolo por completo, y se dejó por 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la fijación de las células. Se lavó con 200  $\mu$ L de PBS 1X pH 7.4 estéril. Se eliminó el PBS sobrante y se añadieron 25,000 células de manera homogénea sobre el cubreobjetos. Se dejó reposando por aproximadamente 10 minutos y se añadieron, con extremo cuidado, 2 mL de medio DMEM suplementado. Para la muestra con NP's, se añadieron los 10  $\mu$ g/mL de NP's a 10% del volumen total. Se incubó el ensayo a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Después de 24 horas, se retiró con extremo cuidado el cubreobjetos, se colocó en una placa nueva, se añadieron 200  $\mu$ L de glutaraldehído 2.5%, se cubrió y se almacenó a 4 °C. Una hora después se añadió PBS 1X para evitar evaporación. Este proceso se repitió para cada muestra y por los siguientes 2 días. Una vez terminado el ensayo, se comienza con el proceso de tinción.

Las muestras se lavaron con PBS 1X por triplicado a temperatura ambiente, luego se lavó tres veces con PBS-Tritón (1:20) y enseguida se añadió PBS 1X-Tritón (1:20) más

albumina de suero bovino (BSA) al 2 %. Las preparaciones se cubrieron de la luz y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después, se lavó tres veces con PBS 1X y tres veces PBS 1X-Tritón (1:20). Se retiró el PBS 1X-Tritón (1:20), se añadió la solución de faloidina 594 en PBS 1X-Triton(1:40) (ImmunoCruz) y se incubó a 37 °C durante una hora. Para teñir con Mito Tracker, se lavó tres veces con PBS 1X y tres veces PBS 1X-Tritón (1:20), se añadieron 100 µL de la solución de Mito Tracker (Abcam) y se incubó por media hora, cubriendo completamente de la luz.

Se retiró cada cubreobjetos de la placa y se eliminó el exceso de solución cuidadosamente con una toallita. Se añadieron dos gotas de 10 µL de glicerina/PBS 1X (50/50) sobre el portaobjetos y se colocó cada cubreobjetos en una gota, cuidando que las células estén en contacto con el portaobjetos y que la glicerina cubra completamente el cubreobjetos. Por último, se fijó el cubreobjetos y se guardaron las muestras a 4 °C protegiéndolas de la luz. Se observaron las muestras en el microscopio confocal Olympus FluoView FV1000 con amplificación de 40x y 2.5x digital.

#### *Análisis estadístico*

Los análisis de viabilidad, proliferación y nitritos se realizaron por triplicado en ensayos independientes. Los resultados están representados en valores de la media aritmética (Ec 1) y su desviación estándar (Ec 2).

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{N} \quad (\text{Ec. 1})$$

$$DE = \sqrt{\frac{\sum |x - \mu|^2}{N}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde  $\bar{X}$  es la media aritmética, DE es la desviación estándar,  $\sum$  significa la sumatoria de los valores,  $x_i$  es el valor del  $i$ -ésimo nivel del factor,  $\mu$  es la media del conjunto de datos y N es el número de datos (Khan Academy, 2021; Thakur, 2021). Adicionalmente a los ensayos de viabilidad, proliferación y nitritos, se les realizó un análisis estadístico de ANOVA de una vía, el cual responde a la ecuación:

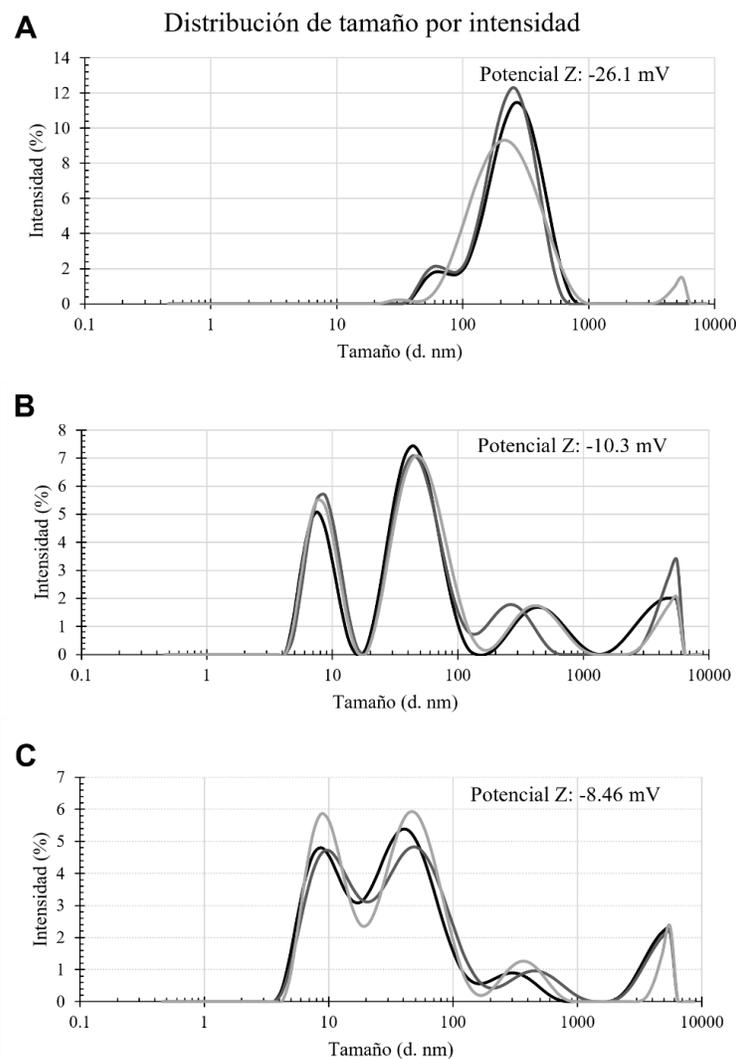
$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde  $H_0$  es la hipótesis nula y  $\mu_i$  es la medida del  $i$ -ésimo nivel del factor (JMP, 2020).

## 8. Resultados

### 8.1 Caracterización de nanopartículas

Las NP's de PMMA-PU fueron caracterizadas por DLS en diferentes medios, analizando las muestras por triplicado para cada medio. En la suspensión de NP's en agua (figura 7A), se obtuvo un promedio 250 nm de diámetro hidrodinámico con una potencial zeta de -26.1 mV. Se pudo observar que existe una distribución de tamaños entre 50 y 650 nm, confirmando una aglomeración de partícula en el medio. Esas mismas partículas, fueron resuspendidas en PBS 1X y en este caso, se observó que el diámetro hidrodinámico promedio fue de 32.64 nm y un potencial Z de -10.3 mV. Se distinguieron dos picos de distribución de tamaño bien definidos, el primero se muestra con diámetros ente 5 y 15 nm y el segundo con diámetros entre 20 y 150 nm, tal y como se aprecia en la figura 7B. Sin embargo, hubo una menor cantidad de partículas aglomeradas presentando diámetros entre 200 y 1000 nm.



**Figura 7.** Distribución de partículas de la muestra PMMA-PU mediante DLS en A) agua, B) PBS 1X y C) medio DMEM suplementado.

Adicionalmente, se realizó una caracterización de las nanopartículas de PMMA-PU en el medio DMEM para analizar la influencia de los componentes del medio en la aglomeración de estos nanoplásticos. Los resultados mostraron la misma distribución de diámetros hidrodinámicos que en el caso del PBS 1X, pero con una mayor tendencia a la aglomeración, debido a que los dos picos con la mayor proporción presentan un solapamiento entre ambas curvas, formando un punto de aglomeración y sumando las curvas de distribución. Esta vez se obtuvo un diámetro hidrodinámico promedio de 38.11 nm además de un potencial zeta de -8.5 mV. Fue posible observar que el número de aglomeraciones de mayor diámetro hidrodinámico (entre 200 y 1000 nm) fue mucho menor con respecto al PBS 1X.

No se observaron diferencias de tamaño significativas entre las partículas en PBS y medio de cultivo celular, ya que ambas curvas mantienen tanto su distribución como su relación (Figura 7B y 7C). La variación que existe entre los tres potenciales Z son un indicio que mientras se mantengan las partículas en el medio de cultivo o en PBS, su variación en el tamaño será menor debido a que tienen una menor tendencia a aglomerarse.

## *8.2 Ensayos de toxicidad in vitro*

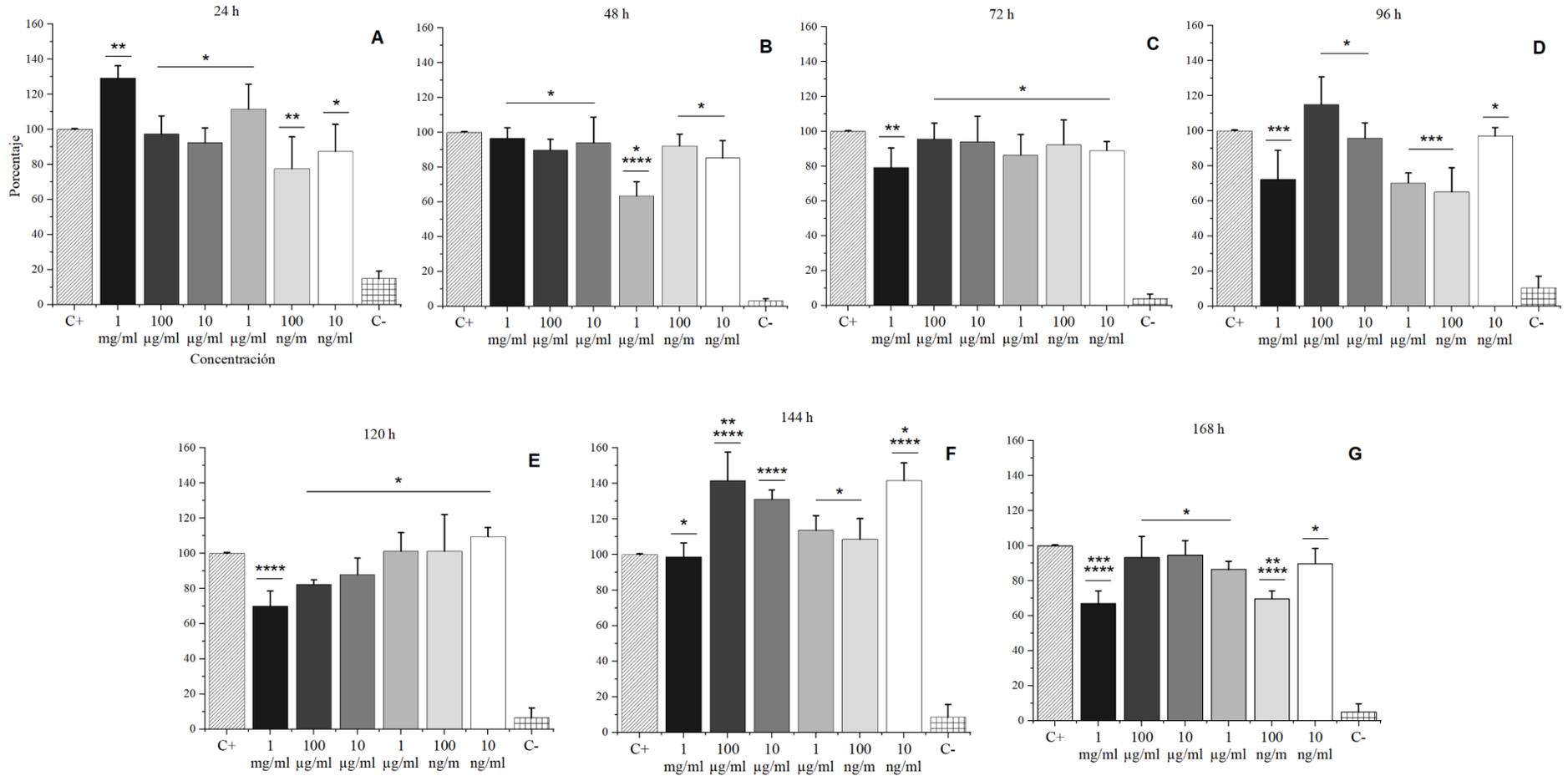
En esta sección se analizó la interacción de la línea celular HCT15 con diferentes concentraciones de nanopartículas de PMMA-PU.

### *8.2.1 Proliferación celular*

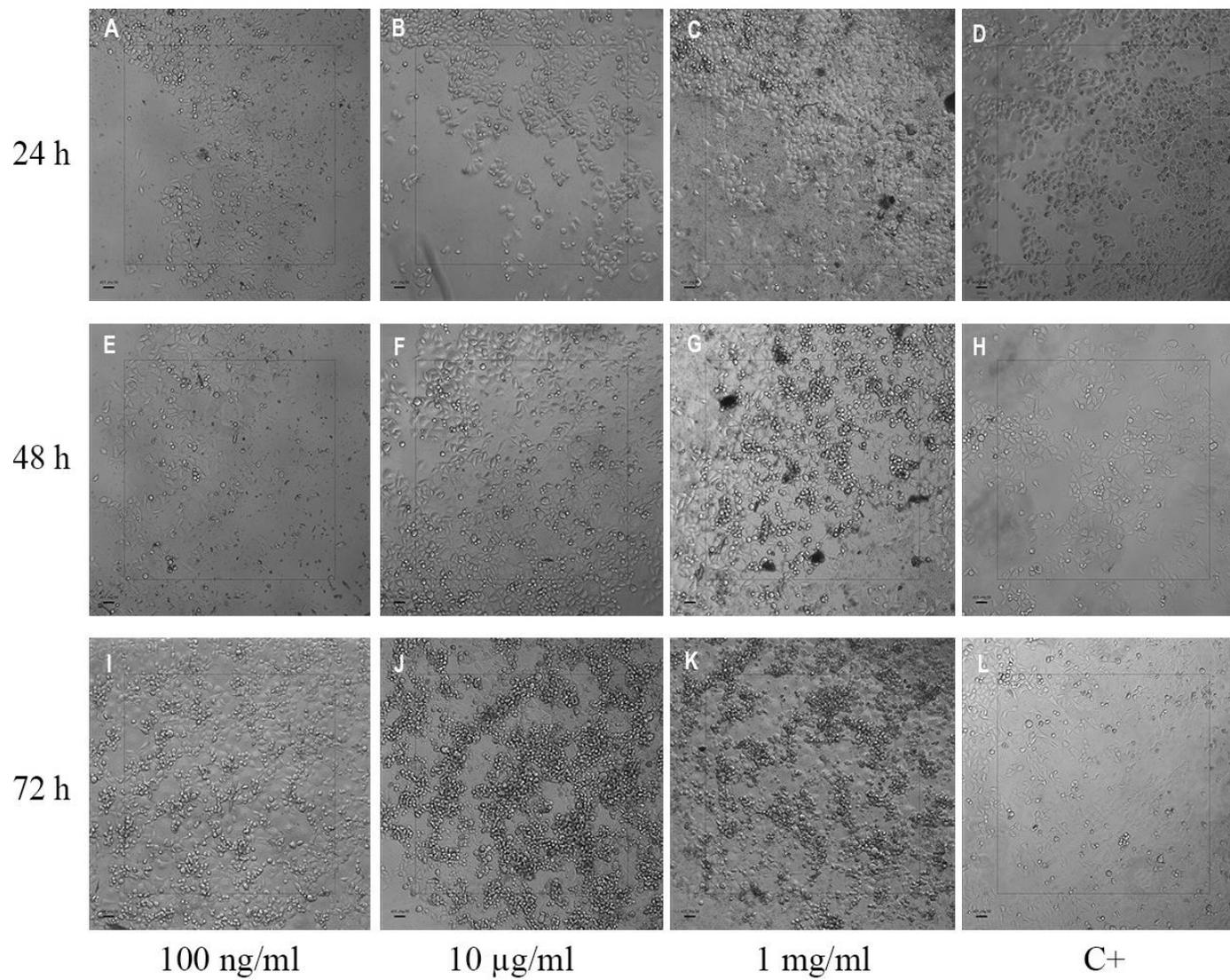
Para conocer los efectos que tienen las NP's sobre la línea celular, fue necesario entender su comportamiento con el paso de los días. Esto se pudo lograr estudiando los ciclos de proliferación en las células durante un periodo de 7 días. Por ello, se realizó el análisis del porcentaje de fluorescencia de la resorufina respecto al control positivo, por un intervalo de 7 días, para determinar la concentración de NP's que causaba una mayor afectación en la proliferación celular.

Este método espectrofluorimétrico permitió determinar el porcentaje de células vivas en cada una de las concentraciones en comparación con las células sin estímulo, como se muestra en la figura 8. Las primeras 24 horas mostraron un incremento considerable en la concentración de 1 mg/mL teniendo un crecimiento de aproximadamente 130% respecto al control positivo. De igual manera, las concentraciones de 100 y 10 ng/mL presentaron una disminución en la reducción de la fluorescencia de la resazurina, de 80% y 85% respectivamente (figura 8A).

## Reducción de resazurina vs Control positivo



**Figura 8.** Análisis de reducción de resazurina vs control de viabilidad celular de la línea HCT15 mediante AlamarBlue a 570 nm, en presencia de diferentes concentraciones de microplástico de PMMA-PU durante las primeras A) 24, B) 48, C) 72, D) 96, E) 120, F) 144 y G) 168 horas. La diferencia no es significativa para \*  $P > 0.05$ ; si los valores de  $P$  son: \*\* $P \leq 0.05$ ; \*\*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\*\* $P \leq 0.0001$ ; \*\*\*\*\* $P \leq 0.00001$ ; \*\*\*\*\* $P \leq 0.000001$ , la diferencia es significativa. Todos los ejes X y Y corresponden a lo indicado en el gráfico A.



**Figura 9.** Imágenes obtenidas con microscopio fluorescente en un ensayo de proliferación por un periodo de tres días.

Pasadas 48 horas, se observó una disminución importante en la reducción de la fluorescencia de la resazurina en las células expuestas a 1  $\mu\text{g/mL}$  (60 %) en comparación con las células control. No obstante, podemos decir de manera general que todos los valores de la media aritmética se encontraron por debajo de los valores del control. Sin embargo, al momento de hacer el análisis estadístico de ANOVA estas muestras no presentaron diferencias significativas (figura 8B). Transcurridas 72 horas, la concentración a la que se observó una mayor disminución (80 %) fue la de 1  $\text{mg/mL}$ , de igual manera, todas las concentraciones se encontraron por debajo de los valores normales (figura 8C).

Para el día cuatro, la concentración de 1  $\text{mg/mL}$  siguió con valores muy por debajo del control (70 %), además, las concentraciones de 1  $\mu\text{g/mL}$  y 100  $\text{ng/mL}$  también disminuyeron considerablemente a un aproximado de 70% y 65 % respectivamente. Por otra parte, aunque para 100  $\mu\text{g/mL}$  la reducción de la fluorescencia aumentó a un 110%, el análisis de ANOVA indica que esta concentración no presentó diferencias significativas respecto al control (figura 8D).

Para el día cinco, se observó un comportamiento muy particular, ya que entre menor fue la concentración mayor fue la proliferación. De igual manera, 1  $\text{mg/mL}$  mantiene la misma tendencia con el menor porcentaje (figura 8E). No obstante, en el día seis, todas las concentraciones se encontraron por encima del valor del control positivo, además estos datos mostraron un comportamiento similar al del día cuatro. Sin embargo, en esta ocasión, se observó que los datos que presentaron una mayor reducción de resazurina, (140 % para las concentraciones de 100  $\mu\text{g/mL}$  y 10  $\text{ng/mL}$ , y un 130% para la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ ), el análisis de ANOVA indicó que estas concentraciones presentaron diferencias significativas considerables comparadas con el control (figura 8F).

Por último, en el séptimo día se observó un comportamiento muy similar al día anterior, pero en esta ocasión todas las concentraciones presentaron valores de reducción por debajo del control positivo. En la gráfica se ve que la máxima reducción, de aproximadamente 90 %, fue para las concentraciones de 100  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  y 10  $\text{ng/mL}$  sin presentar diferencias significativas. Al mismo tiempo, se aprecia que las diferencias significativas más grandes, fueron para las concentraciones de 1  $\text{mg/mL}$  y 100  $\text{ng/mL}$ .

#### *8.2.1.1 Observación de los cultivos celulares por microscopía óptica*

Además de analizar el comportamiento de la proliferación, también es necesario analizar la morfología presentada por las células para determinar si las células que están creciendo se encuentran morfológicamente normales o presentan alteraciones. Debido a esto, durante el ensayo anterior se realizó un seguimiento de la morfología de las células por microscopía óptica. Dada la cantidad de imágenes obtenidas, solo se incluyeron las más representativas (figura 9). En este caso, las imágenes sólo se tomaron los primeros tres días, ya que, hasta las

72 horas existían cambios significativos en morfología y número de células de las concentraciones con respecto al control positivo.

En las primeras 24 horas las células presentaron una morfología normal y la cantidad de células vivas en las tres concentraciones es similar al control positivo. Cabe mencionar que, en el caso de la mayor concentración, se puede observar zonas muy oscuras y una superficie rugosa, lo que corresponden a las nanopartículas.

Transcurridas 48 horas de ensayo, podemos observar que la concentración de 1 mg/mL tiene una mayor cantidad de células y que estas han comenzado a aglomerarse. Después de 72 horas, se observó que en todas las concentraciones existe una gran cantidad de células comparado con el control, similar a los datos obtenidos en el ensayo de viabilidad celular (figuras 8C).

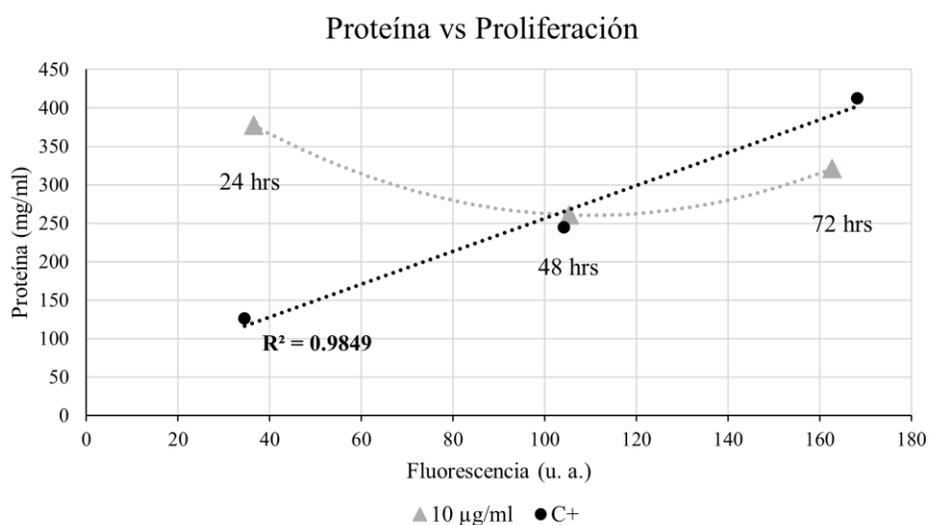
No obstante, en conjunto con los ensayos de proliferación se observó que para 10  $\mu\text{g/mL}$  no hay variación respecto al control positivo para 24 y 48 horas, pero se observó un mayor crecimiento de las células a 72 horas (figuras 8I, 8J y 8K). Sin embargo, aunque la cantidad de células fue mayor, estas no cubrían la superficie de la placa y formaban cúmulos o aglomeraciones (figuras 8J y 8K), mostrando un crecimiento en vertical. Para los demás ensayos se decidió trabajar con la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  para los ensayos de proteína, apoptosis y MitoTracker, ya que fue la mínima concentración a la que las células mostraron cambios significativos.

### *8.2.2 Medición de proteína*

Debido a los cambios morfológicos presentes y tomando en cuenta los ensayos de proliferación, fue necesario entender el crecimiento celular por medio del incremento en la biomasa. Esto se llevó a cabo cuantificando la proteína y para esto se seleccionó la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ . De acuerdo con los resultados obtenidos, el control positivo presentó un crecimiento constante en la concentración de proteína con el paso de los días (figura 10), lo cual puede ser un indicador de una proliferación continua de las células estudiadas.

Con una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  de NP's de PMMA-PU, en las primeras 24 horas se determinó una mayor concentración de proteínas con tres veces más proteína respecto al control con 475 mg/mL y 135 mg/mL respectivamente, indicando una actividad alta de proliferación. Sin embargo, a las 48 horas, la concentración de proteína era muy similar al control con valores alrededor de 250 mg/mL y aunque para las 72 horas se observó un aumento, el crecimiento seguía siendo menor al control donde se obtuvo 400 mg/mL para el control y 310 mg/mL para la concentración de NP's, tal y como se muestra en la figura 10.

Para determinar la relación entre la cantidad de biomasa existente y el crecimiento celular, se realizó una comparación entre la concentración de proteína y la proliferación obtenida en los ensayos anteriores, utilizando la fluorescencia obtenida para la concentración de 10 µg/mL durante los primeros 3 días. Los resultados que se observan en la figura 9 muestran que, la proliferación mantiene valores de fluorescencia muy similares entre el control y las células con NP's para cada uno de los días de experimentación. Sin embargo, la cantidad de biomasa mostró comportamientos diferentes ya que en el caso del control el incremento de la fluorescencia estaba directamente relacionada con el incremento en la biomasa, mientras que los valores de fluorescencia obtenidos de las células en presencia de nanoplasticos, no mostró estar relacionado con el incremento en la biomasa (Figura 10).



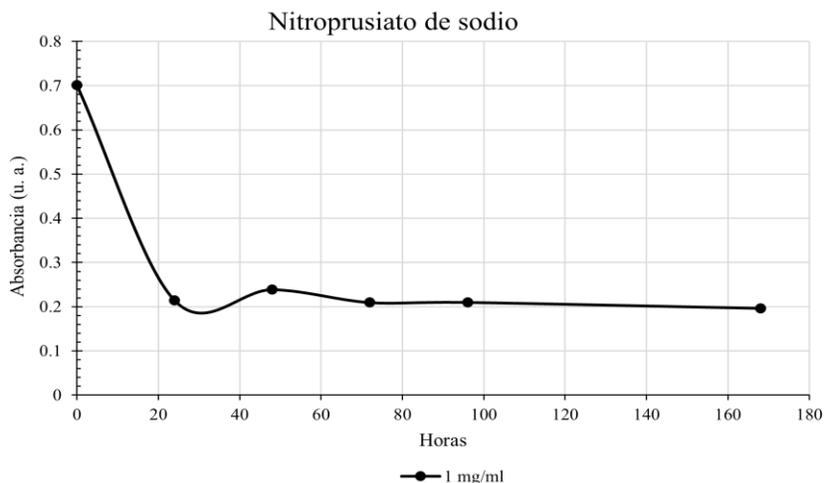
**Figura 10.** Ensayo de medición de proteína por medio de BCA y evaluación del cambio en la cantidad de proteína respecto a la proliferación celular.

### 8.2.3 Nitritos

El incremento de nitritos en las células está relacionado a una respuesta pre-inflamatoria de estas células epiteliales. Una respuesta pre-inflamatoria continua, puede generar complicaciones médicas como colitis (Kolios et al., 1998). En este caso, Las HCT15 al ser células epiteliales, son células dedicadas a la absorción de nutrientes permitiendo su paso hasta los vasos sanguíneos adyacentes al musculo liso o involuntario. Es por eso, que la producción o inhibición de los nitritos tiene una consecuencia directa en las funciones o mecanismos de acción de las células posteriores cómo lo puede ser una respuesta inflamatoria (Kolios et al., 1998). Por esta razón, se realizó la medición de nitritos mediante la prueba de Griess. La figura 11 muestra los resultados obtenidos de la concentración µM de óxido nítrico para las diversas concentraciones de NP's de PMMA-PU durante 3 días.



periodo de 7 días, tomando en cuenta el día 0, y los datos obtenidos se representaron en la figura 12.



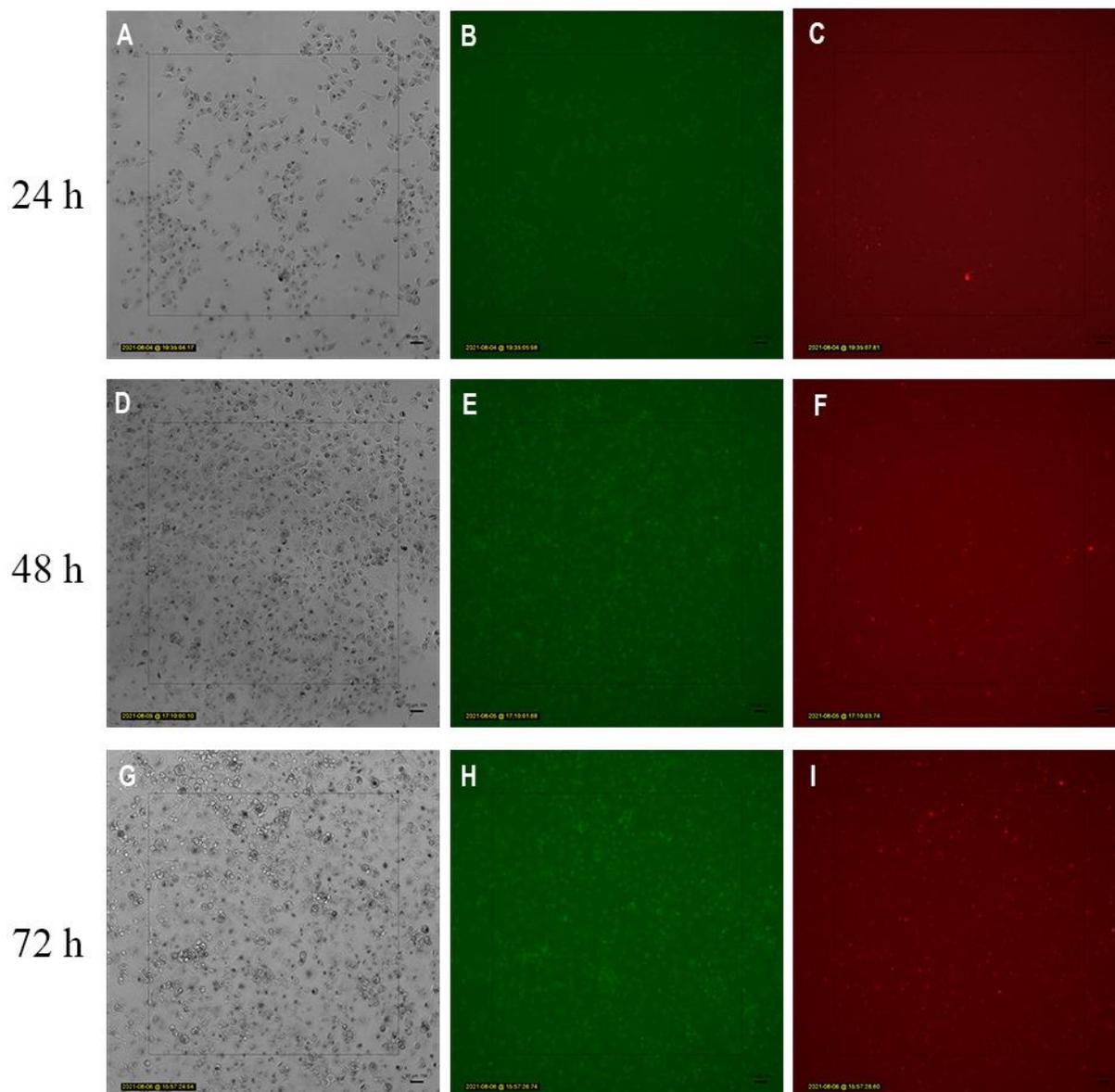
**Figura 12.** Evaluación de absorción de Nitroprusiato de sodio para 1 mg/mL de PMMA-PU en una solución de PBS a una longitud de onda de 395 nm.

Los resultados mostraron que las NP's absorben rápidamente el nitroprusiato de sodio en el medio, ya que inicialmente al momento de colocar las nanopartículas de PMMA-PU en la solución con nitroprusiato de sodio (tiempo cero), se obtuvo un valor de absorbancia de 0.7017 u.a, y pasadas 24 horas se observó que esta absorbancia disminuyó considerablemente a un valor medio de 0.2 u.a., la cual se mantuvo hasta el final del ensayo (168 horas). Aunque a las 48 horas se observa un ligero aumento, se asocia a un error de manipulación, ya que se mantienen cerca del valor medio de los siguientes días.

#### 8.2.4 Apoptosis

Con el análisis de los ensayos anteriores, se conoce que existe una alteración en el ciclo celular, remarcando que, aunque visualmente por microscopia óptica hay un número elevado de células, se desconoce el estadio celular en el que se encuentran. Por ello, se utilizó un análisis rápido de apoptosis, para comprobar si el total de células observadas por microscopia se encontraban viables y poder determinar el tipo de muerte celular que se presentaba en las células por la presencia de las NP's utilizando una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ . Se realizó un seguimiento visual mediante el marcador de viabilidad el reactivo naranja de Acridina, el cual ayuda determinar si la muerte celular es debido a apoptosis.

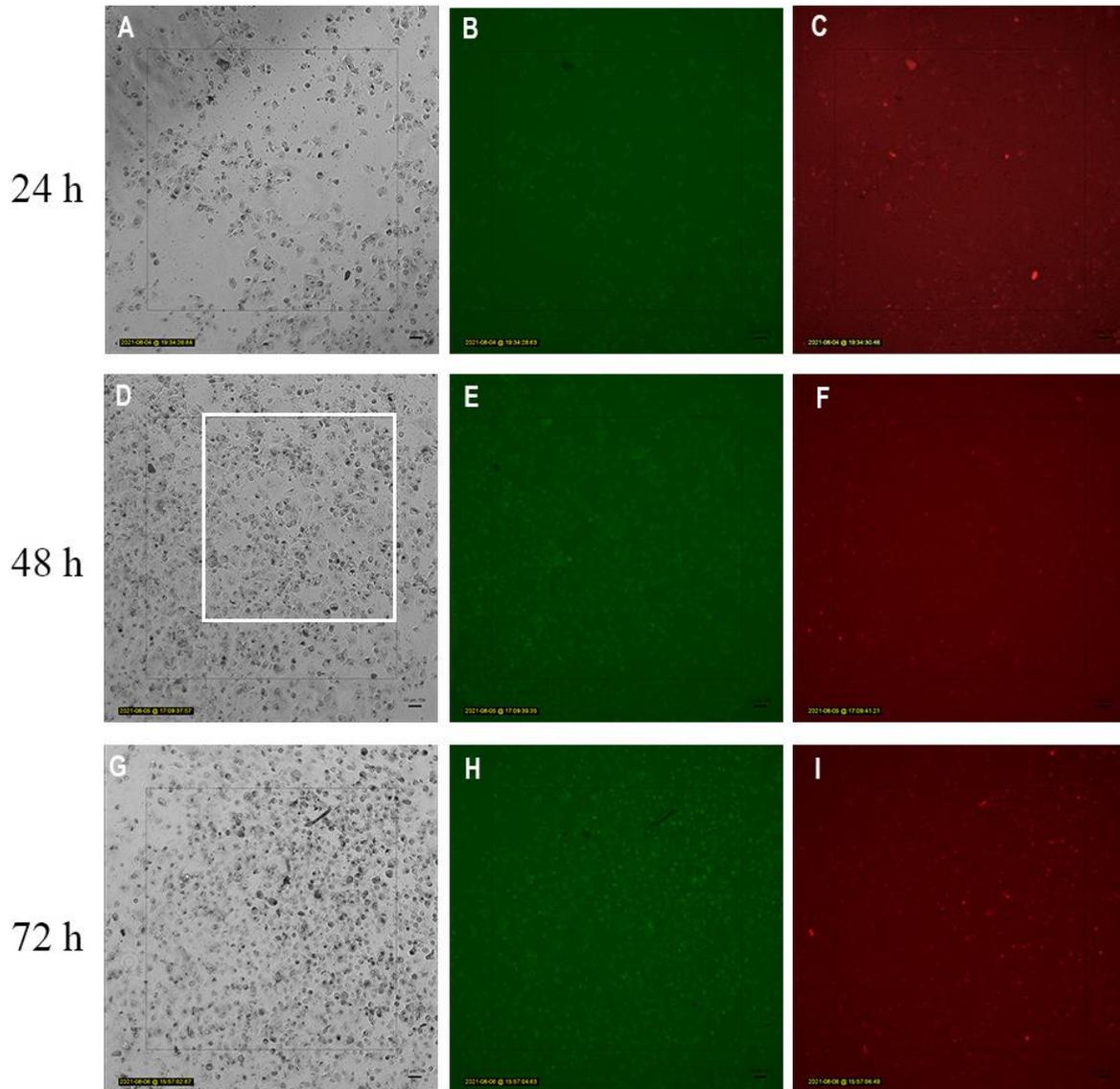
C+



**Figura 13.** Ensayo de naranja de acridina en un cultivo celular de HCT15 como control positivo por un periodo de 3 días.

Las imágenes obtenidas, mostraron la morfología presentada por las células durante un periodo de tres días, así mismo, se observó la intensidad de fluorescencia en las células teñidas, lo que permitió diferenciar entre células vivas (verde fluorescente) y muertas o en apoptosis (naranja/rojo) tal y como se muestra en la figura 13. Analizando las imágenes obtenidas, durante las primeras 24 horas, la morfología en las células con NP's comenzó a cambiar, tornándose esféricas, aunque la mayoría seguía en su forma más extendida (figura 14A). También se observó que, respecto al control positivo (figura 13A), hubo una mayor dispersión de las células, ya que se encuentran células entre las NP's (figura 14A).

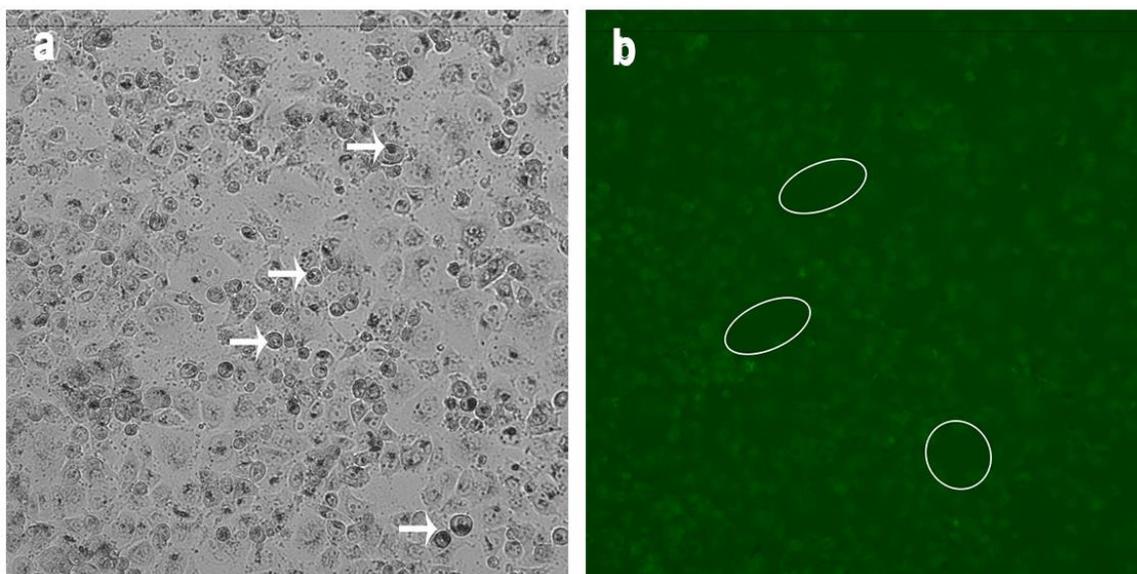
10  $\mu\text{g/ml}$



**Figura 14.** Ensayo de naranja de acridina en un cultivo celular de HCT15 con una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  por un periodo de 3 días.

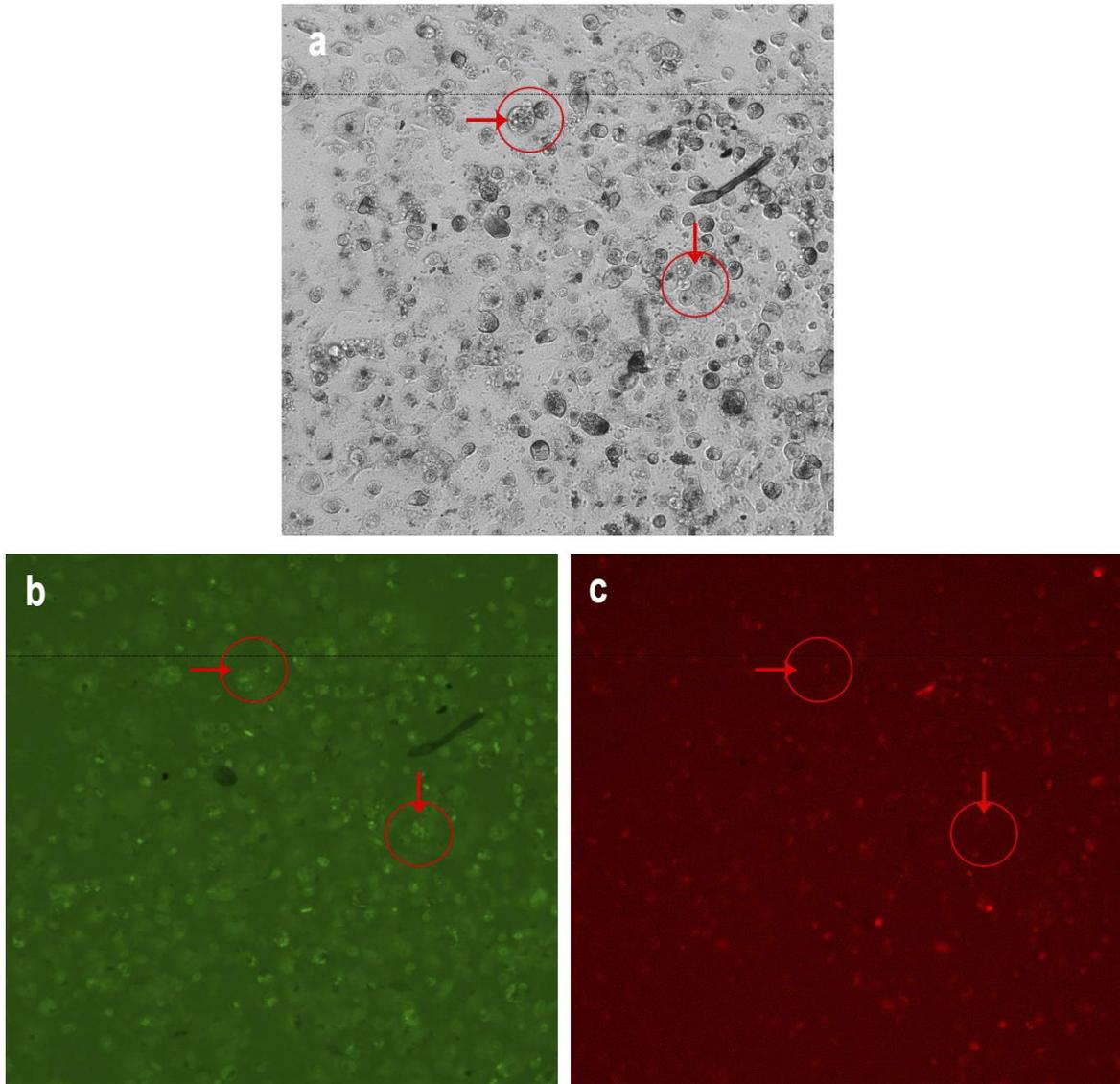
Si hacemos un acercamiento a la figura 14D como se muestra en el recuadro blanco, a las 48 horas, se logra observar en el caso de las células con NP's que, la superficies de la placa muestra una capa homogénea de células. La mayoría de estas células mostraban una morfología esférica y se observaron pequeños puntos dentro de las células, tal y cómo se muestra en la figura 15a marcado por flechas.

Analizando las imágenes de emisión en verde (figura 14E), se observó que las células del control positivo tuvieron poca distancia entre ellas, ya que hubo una distribución celular uniforme en la placa, caso contrario, las células con NP's, ya que estas presentaron un mayor espaciamiento entre ellas como se observa en los óvalos de la figura 15b.



**Figura 15.** Ampliación de las figuras a) 13D y b) 13B, mostrando la morfología esférica de la línea celular HCT15 después de 48 horas de ensayo.

Por último, en el tercer día de ensayo, se observó que ninguna de las células incubadas con NP's, presentó una morfología similar al control, ya que un gran número de células presentó una cantidad considerable de vesículas en su interior y una apariencia granulosa, cómo se señala en la figura 15a. Por otra parte, en este punto comenzaron a observarse aglomeraciones de células esféricas, tal como se observaba en las imágenes de los ensayos de proliferación. Al observar la emisión en verde (figura 16b), se pudo ver que la intensidad se redujo considerablemente en las células anteriormente señaladas, incluso fueron muy poco visibles en esta emisión.



**Figura 16.** Ampliación de las figuras a) 13G, b) 13H y c) 13I, mostrando la morfología granulada de la línea celular HCT15 después de 72 horas de ensayo.

Por otra parte, en la figura 16c, se observó que pocos fueron los núcleos de las células que pudieron ser visibles con el filtro rojo. A pesar de que en la imagen de contraste de fases parece que existe una saturación de células (figura 14G), con el filtro verde la intensidad fue muy poca para las células (figura 14H) observadas, mientras que en el caso del filtro rojo (figura 14I) la cantidad de células que fueron observables con este filtro fue muy similar a lo observado en el control positivo en el mismo tiempo de estudio (figura 13I). En este caso, aunque esperábamos una mayor cantidad de células en apoptosis, las imágenes obtenidas no mostraron que existiera una diferencia significativa respecto al control positivo.

### 8.3 Mito-ID® Red

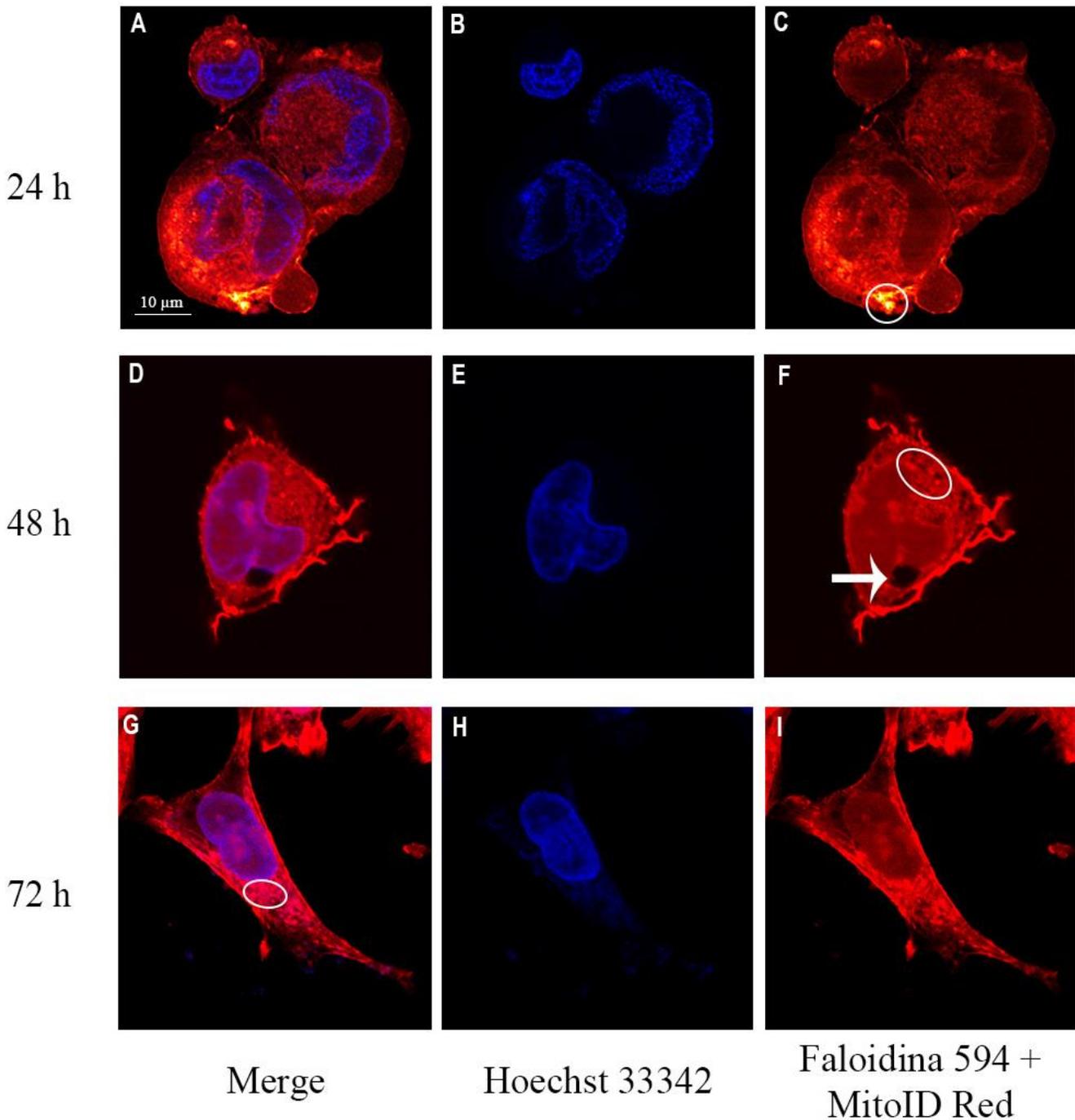
Uno de los daños que pueden ocasionar la presencia de nanopartículas en las células, puede llevarse a cabo en las mitocondrias. Para poder llevar a cabo este análisis, se realizaron observaciones por microscopia confocal después de realizar el marcaje de las mitocondrias (MitoID) y las fibras de actina (faloidina 549), cómo se observa en las figuras 17 y 18.

Las imágenes muestran como a las primeras 24 horas, se observa una colocación de la señal de las mitocondrias y la actina filamentosa (en amarillo) tanto en las células sin estímulo como en las células en presencia de NP's, esto se muestra encerrado en el círculo blanco de las figuras 17C y 18C respectivamente. Después de 48 horas, podemos observar en el óvalo blanco de la figura 17F que las mitocondrias se encontraron cerca del núcleo, pero con menor intensidad con respecto al día anterior; sin embargo, el número de mitocondrias fue similar. Además, esta célula contiene cerca del núcleo lo que parece ser una vesícula de tamaño regular (flecha de la figura 17F), pero en el lado opuesto a las mitocondrias (círculo blanco). Para las 72 horas, fue imposible diferenciar entre la tinción para mitocondrias y las fibras de actina lo que al parecer era una sobreposición de las señales, no obstante, fue posible identificar a las mitocondrias, como se observa en la figura 17G (óvalo blanco).

Para las células con 10 µg/mL de NP's, las imágenes fueron muy diferentes ya que se observó a las 24 horas una alta actividad mitocondrial, lo cual se puede ver claramente debido a la intensidad de amarillo (figura 18C). Otro punto destacable es que el número de mitocondrias existentes fue mayor con respecto al control, pero su ubicación se localizó completamente rodeando al núcleo como se observa en el círculo blanco de la figura 18C.

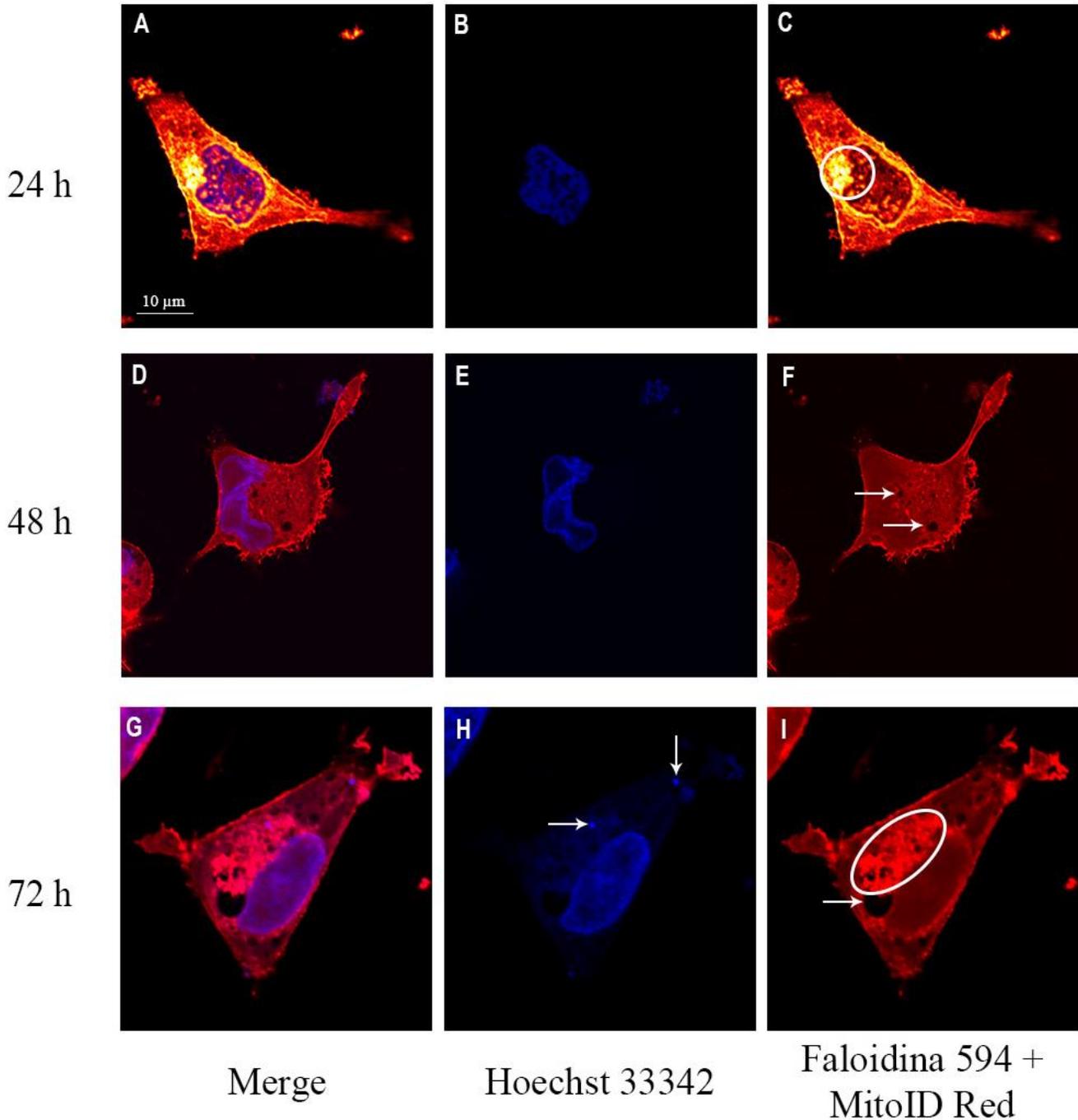
Es importante mencionar que, a partir de las 48 horas, la intensidad del rojo comenzó a aumentar drásticamente en las muestras que contenían NP's de PMMA-PU por lo que la figura 18 muestra imágenes con una intensidad fija (figura 18D a 18I) que permite observar los detalles presentados por la célula. Después de 48 horas, la célula con NP's comenzó a cambiar su morfología a una forma más esférica y con un núcleo de menor tamaño respecto al control. Al igual que a las 24 horas, existe un mayor número de mitocondrias respecto al control, esta vez localizadas alrededor del núcleo y localizadas cerca de la gran cantidad de vesículas formadas, como se señala con las flechas blancas en la figura 18F, lo que muestra un aspecto granuloso en la célula (figura 18D).

## Control



**Figura 17.** Imágenes del control positivo de la línea celular de HCT15 obtenidas por microscopio confocal. Las mitocondrias fueron teñidas con MitoID Red (rojo/amarillo), la actina con faloidina 594 (rojo) y los núcleos con Hoeschst 33342 (azul). Todas las imágenes presentan la misma escala mostrada en la figura A.

## PMMA-PU NP's



**Figura 18.** Imágenes de la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  de NP's en la línea celular de HCT15 obtenidas por microscopio confocal. Las mitocondrias fueron teñidas con MitoID Red (rojo/amarillo), la actina con faloidina 594 (rojo) y los núcleos con Hoeschst 33342 (azul). Todas las imágenes presentan la misma escala mostrada en la figura A.

De manera drástica, a 72 horas, la célula con NP's presentó una gran cantidad de vesículas, y el tamaño de estas vesículas fue considerablemente mayor cómo la señalada con la flecha blanca de la figura 18I. Se puede observar que esta vez, las mitocondrias se encontraron sobre la zona de mayor incidencia de vesículas y la intensidad del rojo es muy alto, lo que dificultó apreciar las mitocondrias de manera individual, cómo se observa en el óvalo blanco de la figura 18I. Aunque la célula no se observa muy esférica, la morfología no es tan extendida y alargada cómo se observó en el control positivo (figura 17G). Adicionalmente se pudo observar en la figura 18H (flechas blancas), la presencia de dos puntos claramente definidos y marcados con Hoechst que pueden asociarse a partículas internalizadas.

## 9. Discusión

Los avances tecnológicos son también una fuente de nuevos contaminantes, como es el caso de los residuos de impresoras 3D, que se usan en la industria, en las escuelas, y muy recientemente en los hogares de todo el mundo (Toor, 2019). Para poder predecir su toxicidad, es importante conocer el tipo de interacción que las nanopartículas puedan tener en medios fisiológicos, lo que determinará la naturaleza de la corona formada sobre la superficie de la nanopartícula y la cual afectará los mecanismos de internalización. En nuestro caso, el medio de cultivo utilizado para el mantenimiento celular *in vitro* de las células HCT15 fue utilizado para determinar la variación en el radio hidrodinámico y el potencial zeta. Los resultados mostraron diferencias dependientes del medio en donde están suspendidas las nanopartículas de PMMA-PU.

Se observó que el diámetro hidrodinámico de las partículas en el agua fue mayor, con un potencial Zeta de -26 mV, lo que indicaría una menor tendencia a la agregación. Esto debido a las interacciones por la polaridad y la carga superficial de las NP's y del agua. Por otra parte, los resultados en el PBS 1X y el DMEM suplementado, mostraron la separación de los diámetros hidrodinámicos en dos grandes grupos en tamaños menores a los 100 nm. Esta dispersión se puede asociar al contenido de los medios, donde las sales son un factor influyente que permite que se den menos interacciones entre las partículas y así su diámetro hidrodinámico no aumente. El PBS 1X al ser una solución amortiguadora con fosfatos, que permite mediante las sales, una interacción baja entre las NP's y el medio, por lo que causa una mejor dispersión de las partículas. El DMEM al contener glucosa, suplemento de suero, glutamato, piruvato de sodio, rojo fenol, suero bovino fetal y PBS, las NP's mantienen una interacción con las sustancias, sobre todo con el PBS, ya que se mantienen los dos picos separadas, sin embargo se apreció un incremento en la cantidad de partículas en el rango de los 20 nm, lo cual puede estar relacionado con la composición del DMEM suplementado, ya que al contener otro tipo de compuestos como proteínas u oligoelementos, estos están también contribuyendo a la formación de la corona lo que se traduce como un incremento en el diámetro hidrodinámico. Sin embargo, no se sabe cuál es el factor o compuesto específico que interactúa sobre las NP's, por lo que serán necesarios más ensayos para poder analizarlo.

Analizando el potencial Z, se mostró que las partículas se veían atraídas por un potencial positivo y presentaron una buena estabilidad de agregación de partículas. Al comprar los tres potenciales Z, se observó que en el agua la resistencia a la agregación es mucho menor con respecto al medio DMEM suplementado y al PBS 1X, sin embargo, no existe una diferencia significativa entre los medios. Esto demostró que las partículas se encontraban en la escala nano una vez que interaccionan con la línea celular con la que se trabajó.

Al asegurar que se trabajó con NP's y que la interacción con el medio no afecta para partículas de menor tamaño, se pudo comenzar con los ensayos de viabilidad y proliferación. Con el ensayo de resazurina se obtuvo la fluorescencia de las células para estudiar tanto la

proliferación como la viabilidad, donde los primeros tres días sirvieron como observación en la viabilidad celular y la continuidad de los 7 días permitió observar la proliferación. Se observó que después de 72 horas, la viabilidad era muy baja, lo que supuso que las NP's presentaron un efecto tóxico sobre la viabilidad de las células. Por otra parte, el ensayo completo de 7 días mostro que existió una alta proliferación celular a partir del tercer día, indicando un punto crítico en la proliferación a partir de las 48 horas.

Durante los primero tres días, los valores oscilan entre 80 % y 110 % mostrando que no existe un efecto citotóxico tan notable. Sin embargo, a partir del cuarto día, las diferentes concentraciones comenzaron a presentar un comportamiento similar entre esos días, mostrando que los primeros tres días son cruciales para los efectos que causa la internalización de las NP's. Dentro de los últimos cuatro días, los valores oscilan entre 70 % y 140 %, y aunque el comportamiento se mantiene constante y muestra una proliferación regular para cada concentración, las diferencias significativas son mayores para las concentraciones afectadas en estos 4 últimos días, observando que existe un efecto citotóxico continuo.

Comparando lo anterior con las imágenes, se demostró que, a pesar de la alta proliferación al tercer día, la viabilidad es baja pero la morfología observada nos indica que las células pueden estar sufriendo un proceso repentino de muerte celular, provocado por la presencia de las NP's en el medio. De acuerdo con la figura 15a, las células con una gran cantidad de vesículas, hecho que se observó tanto por fluorescencia con el naranja de acridina como por microscopía confocal, pueden indicar un proceso de muerte celular por apoptosis, ya que, en este tercer día las aglomeraciones demostraron que las células no se encuentran en su forma alargada normal, si no con una forma mayormente esférica. Esta morfología puede asociarse a que las células están tratando engullir las NP's, causando una menor interacción entre ellas mismas.

Al comparar los valores de fluorescencia obtenidos en el ensayo de proliferación, con las imágenes de este mismo ensayo, se buscó relacionar la cantidad de células activas con respecto a lo observado, por lo que se cuantificó la cantidad de biomasa existente en el ensayo. Esta medición se realizó por medio de la cuantificación de proteína, donde la variación que existe entre la cantidad de proteína en el cultivo y la reducción de resazurina durante los tres días, fue un indicativo de cambio en la fisiología celular, obteniendo una mayor actividad metabólica en una menor cantidad de células. Esto justificaría por que observamos una gran cantidad de células aglomeradas que comienza desde las 48 horas y a las 72 horas, mostrando una placa con un alto grado de saturación.

Para entender un poco mejor esta respuesta de las células, se cuantificó la liberación de nitritos en el medio, tratando de relacionar la actividad alta de proliferación, con una liberación constante de nitritos. Se observó el aumento de nitritos a las 48 horas respecto al control positivo, en especial con la concentración de 1 mg/mL.

Este incremento de nitritos en el medio es un factor que se ha visto relacionado como una respuesta pre-inflamatoria de estas células epiteliales. De acuerdo con Kolios y colaboradores, una respuesta pre-inflamatoria continua, puede generar complicaciones médicas como colitis (Kolios et al., 1998). En este punto es importante mencionar que, para el control negativo, los valores de nitritos en el medio son similares, se tiene que considerar que solo tenemos un aproximado de entre 5 y 10 % de las células vivas en el cultivo, demostrando que tenemos valores relativamente altos de nitritos durante los primeros 2 días. Al cabo de 72 horas, observamos la disminución rápida de estos nitritos en el medio. Esto se puede asociar al menor número de células activas en el cultivo o a una absorción de nitritos en consecuencia de la polaridad de las NP's de PMMA-PU.

Para comprobar si las partículas estaban absorbiendo los nitritos, se realizó el ensayo con nitroprusiato de sodio, ya que, por medio de la reducción de nitroprusiato de sodio, se puede generar óxido nítrico. Se observó que existe una caída abrupta para una posterior estabilización de la concentración, en una cinética de saturación (figura 12). Las NP's adsorben rápidamente el nitroprusiato saturándose después de las primeras 24 horas de estar en un medio con una concentración alta de nitritos. Esto explica porque existe una caída de nitritos después de 72 horas de exposición a las NP's, ya que a las 48 horas de exposición se disparó la concentración de nitritos. La absorción por parte de las NP's dificulta dar una explicación precisa si es que existe o no una respuesta inflamatoria por parte de las células.

Para poder relacionar los efectos observados con algún mecanismo, se requirió de analizar si las células tendían a un mecanismo de muerte celular. Con ello, se analizaron los ensayos de apoptosis que se observa que para las primeras 24 horas, las células aún están adaptándose a la presencia de las nanopartículas en el medio, por lo que la proliferación y adhesión celular se ve disminuida. La falta de adhesión y la poca proliferación, permite que la intensidad en la longitud de onda verde (supervivencia celular) sea igual tanto en el control como en las células con estímulo.

Después de 48 horas, se asoció que las NP's se han internalizado debido a los puntos dentro de las células observados en las imágenes. Además, el espaciamiento existente entre las células puede significar una producción de mayor matriz extracelular o poca comunicación intercelular, esto puede causar en el cambio en la morfología de las células o alterar su proliferación, por lo que se puede comenzar con un crecimiento en vertical.

Los cambios observados durante los días anteriores dan pie a que, para las 72 horas, las células tengan una morfología granulosa. La granulosidad observada en las células se asocia al intento de eliminación de las NP's por lo que se presenta un efecto de contracción de las células para terminar en una morfología esférica. De igual manera, el cambio en la intensidad de emisión en verde indicó que muchas de las células están comenzando a morir, y a pesar de que la proliferación se ve aumentada, la supervivencia de las células comienza a ser muy baja, indicando que las 72 horas son un punto crítico para las células.

Al obtener que los tres primeros días son cruciales para los efectos citotóxicos de las NP's en las células, se realizó el estudio de tinción y así poder determinar cambio morfológicos más concretos. Con la tinción con faloidina 594 y MitoID Red se pretendió analizar tanto la actina filamentosa, cómo las mitocondrias por separado, sin embargo, la señal emitida en el confocal por ambos marcadores se sobreponía debido a que las longitudes de onda de ambas tinciones eran muy cercanas. Para MitoID Red se tiene una longitud de onda de excitación/emisión de 579/599 y para faloidina 594 una de 581/609. Por ello, se tuvo que utilizar el mismo filtro para ambas tinciones, dificultando la distinción entre cada una. No obstante, la intensidad de la señal de las mitocondrias era mayor a la de la actina filamentosa.

Sabiendo esto, a las 24 horas de ensayo la aglomeración de mitocondrias alrededor del núcleo y su alta actividad asociada a la intensidad del amarillo con respecto al control son una alteración causada por NP's de PMMA-PU que se encontraban en el medio, provocando que el ciclo mitocondrial se viera afectado y existiera una sobreproducción de mitocondrias, lo que podría ser un indicio del comienzo de una apoptosis.

Después de 48 horas y 72 horas, la intensidad de las muestras para la tinción de MitoID Red demostró una actividad mitocondrial muy alta. Pero pasadas 48 horas, la célula estaba pasando por un proceso de respuesta a las NP's, por lo que la vesiculación elevada mostró el intento de eliminación o expulsión de las NP's del interior de la célula. La presencia de mitocondrias cerca de las vesículas confirmó este evento, ya que se requiere de una alta cantidad de energía para poder crear estas vesículas y posteriormente expulsarlas.

Por último, transcurridas 72 horas, la cantidad de mitocondrias y la actividad mitocondrial tan alta demostraron que el proceso de vesiculación y el tamaño de las vesículas existentes está aumentando, este proceso puede implicar la muerte apoptótica de las células, lo que explica la disminución en la intensidad de emisión en el ensayo de acridina, mostrando que, aunque existe una cantidad de células alta, una gran parte de las células se encuentra en un proceso de muerte celular.

## 10. Conclusiones

Una de las rutas de internalización de nanoplasticos en el ser humano que más preocupa es por ingestión, por lo que es importante conocer los efectos que estos nanomateriales puedan tener en modelos celulares. Por ello, a partir de las investigaciones y experimentaciones realizadas en este trabajo de tesis podemos concluir lo siguiente:

- Existen cambios significativos importantes en la proliferación y morfología a nivel celular que se observaron pasadas 72 horas de ensayo.
- Estos cambios se observan principalmente entre las concentraciones entre las concentraciones de 1  $\mu\text{g/mL}$  y 10  $\mu\text{g/l}$ .
- Se demostró que la presencia de NP's altera la fisiología celular de manera general, sin ser dependiente de la concentración.
- Aunque los valores de fluorescencia son similares entre el control y la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ , los valores de cuantificación de la biomasa presentan diferencias significativas con respecto al control.
- No se observan efectos relevantes en la liberación de nitritos por parte de las células debido a que las nanopartículas tiene una capacidad de absorción de nitroprusiato de sodio, lo que genera un resultado no concluyente.
- No se puede concluir que las células presenten un proceso de apoptosis normal en presencia de las NP's de PMMA-PU, pero se observa un cambio en la morfología a una forma esférica y una vesiculación continua.
- Las NP's de PMMA-PU causan un incremento en la actividad mitocondrial de las células y generan una aglomeración alrededor del núcleo. De igual manera, Después de 48 horas las células presentan inicios de vesiculación y con el paso del tiempo un incremento en el tamaño de las vesículas y una aglomeración de mitocondrias a su alrededor.

## Bibliografía

- Aguilar-Guzmán, J. C., Bejtka, K., Fontana, M., Valsami-Jones, E., Villezcas, A. M., Vazquez-Duhalt, R., & Rodríguez-Hernández, A. G. (2022). Polyethylene terephthalate nanoparticles effect on RAW 264.7 macrophage cells. *Microplastics and Nanoplastics 2022 2:1*, 2(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S43591-022-00027-1>
- American Chemistry Council. (2016). *Plastic Packaging Resins Resin Codes Descriptions Properties Product Applications Products Made with Recycled Content*. <https://plastics.americanchemistry.com/Plastic-Resin-Codes-PDF/>
- ATCC. (2021). *HCT-15 / ATCC*. <https://www.atcc.org/products/ccl-225>
- Barcellos Da Costa, M., Oliveira, M., Santos, D., Maria De Farias Viegas, G., Ronald, E., Ocaris, Y., Caniçali, F. B., Dos, C., Cozer, R., Carvalho Zamprogno, G., Beatriz, M., & Otegui, P. (2021). *Quantitative evaluation of microplastics in colonies of Phragmatopoma caudata Krøyer in Mörch, 1863 (Polychaeta-Sabellariidae): Analysis in sandcastles and tissues and identification via Raman spectroscopy*. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112127>
- Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1985–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205>
- Bellasi, A., Binda, G., Pozzi, A., Boldrocchi, G., & Bettinetti, R. (2021). *The extraction of microplastics from sediments: An overview of existing methods and the proposal of a new and green alternative*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130357>
- Browne, M. A. (2013). *Rochman 2013\_Classify Plastic Waste as hazardous\_Nature*. 6–8.
- Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., & Thompson, R. (2011). Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: Sources and sinks. *Environmental Science and Technology*, 45(21), 9175–9179. <https://doi.org/10.1021/es201811s>
- Chae, Y., & An, Y. J. (2017). Effects of micro- and nanoplastics on aquatic ecosystems: Current research trends and perspectives. *Marine Pollution Bulletin*, 124(2), 624–632. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.070>
- da Costa, J. P., Santos, P. S. M., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2016). (Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects. *Science of the Total Environment*, 566–567, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.041>
- Diaz-Basantes, M. F., Conesa, J. A., & Fullana, A. (2020). Microplastics in Honey, Beer, Milk and Refreshments in Ecuador as Emerging Contaminants. *Sustainability 2020, Vol. 12, Page 5514*, 12(14), 5514. <https://doi.org/10.3390/SU12145514>
- Eastern Regional Research Center. (2020). *What is Pyrolysis? : USDA ARS*. <https://www.ars.usda.gov/northeast-area/wyndmoor-pa/eastern-regional-research-center/docs/biomass-pyrolysis-research-1/what-is-pyrolysis/>
- Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., Galgani, 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(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111913>
- European-Plastics. (2015). An analysis of European plastics production, demand and waste data. In *Plastics – the Facts*. [https://www.plasticseurope.org/application/files/3715/1689/8308/2015plastics\\_the\\_facts\\_14122015.pdf](https://www.plasticseurope.org/application/files/3715/1689/8308/2015plastics_the_facts_14122015.pdf)
- Fu, J., Zou, Y., Huang, Z., Yan, C., Zhou, Q., Zhang, H., Lai, Y., Peng, S., & Zhang, Y. (2015). Identification of nitric oxide-releasing derivatives of oleanolic acid as potential anti-colon cancer agents. *RSC Advances*, 5(25), 19445–19454. <https://doi.org/10.1039/c5ra00270b>
- Guo, Y., Han, B., Luo, K., Ren, Z., Cai, L., & Sun, L. (2016). *NOX2-ROS-HIF-1 $\alpha$*  signaling is critical for the inhibitory effect of oleanolic acid on rectal cancer cell proliferation. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.091>
- Harris, L. S. T., Gill, H., & Carrington, E. (2021). *Microplastic changes the sinking and resuspension rates of marine mussel biodeposits*. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112165>
- Hernández-Arenas, R., Beltrán-Sanahuja, A., Navarro-Quirant, P., & Sanz-Lazaro, C. (2021). The effect of sewage sludge containing microplastics on growth and fruit development of tomato plants. *Environmental Pollution*, 268, 115779. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2020.115779>
- Hernandez, L. M., Yousefi, N., & Tufenkji, N. (2017). Are there nanoplastics in your personal care products? *Environmental Science and Technology Letters*, 4(7), 280–285. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.7b00187>
- Hirt, N., & Body-Malapel, M. (2020). Immunotoxicity and intestinal effects of nano- and microplastics: a review of the literature. *Particle and Fibre Toxicology* 2020 17:1, 17(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/S12989-020-00387-7>
- Honus, S., Kumagai, S., Fedorko, G., Molnár, V., & Yoshioka, T. (2018). Pyrolysis gases produced from individual and mixed PE, PP, PS, PVC, and PET—Part I: Production and physical properties. *Fuel*, 221, 346–360. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.02.074>
- Horton, A. A., Walton, A., Spurgeon, D. J., Lahive, E., & Svendsen, C. (2017). Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Science of the Total Environment*, 586, 127–141. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.190>
- Hottinger, D. G., Beebe, D. S., Kozhimannil, T., Prielipp, R. C., & Belani, K. G. (2014). Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, 30(4), 462. <https://doi.org/10.4103/0970-9185.142799>
- JMP. (2020). *ANOVA de un factor | Introducción a la estadística | JMP*. [https://www.jmp.com/es\\_mx/statistics-knowledge-portal/one-way-anova.html](https://www.jmp.com/es_mx/statistics-knowledge-portal/one-way-anova.html)
- Jobgen, W. S., Jobgen, S. C., Li, H., Meininger, C. J., & Wu, G. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological samples using high-performance liquid chromatography.

- Journal of Chromatography B*, 851, 71–82.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.018>
- Kasar, P., Sharma, D. K., & Ahmaruzzaman, M. (2020). Thermal and catalytic decomposition of waste plastics and its co-processing with petroleum residue through pyrolysis process. *Journal of Cleaner Production*, 265, 121639.  
<https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2020.121639>
- Khan Academy. (2021). *Calcular la desviación estándar paso a paso (artículo) | Khan Academy*. Khan Academy. <https://es.khanacademy.org/math/probability/data-distributions-a1/summarizing-spread-distributions/a/calculating-standard-deviation-step-by-step>
- Kokalj, A. J., Hartmann, N. B., Drobne, D., Potthoff, A., & Kühnel, D. (2021). Quality of nanoplastics and microplastics ecotoxicity studies: Refining quality criteria for nanomaterial studies. *Journal of Hazardous Materials*, 415, 125751.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125751>
- Kolios, G., Rooney, N., Murphy, C. T., Robertson, A. F., & Westwick, J. (1998). Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. *Gut*, 43, 56–63.  
<https://doi.org/10.1136/gut.43.1.56>
- Lindwall, C. (2020, January 9). *Single-Use Plastics 101 | NRDC*. NRDC.  
<https://www.nrdc.org/stories/single-use-plastics-101>
- Liu, L., Xu, K., Zhang, B., Ye, Y., Zhang, Q., & Jiang, W. (2021). Cellular internalization and release of polystyrene microplastics and nanoplastics. *Science of The Total Environment*, 779, 146523. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.146523>
- Ma, Y., Huang, A., Cao, S., Sun, F., Wang, L., Guo, H., & Ji, R. (2016). Effects of nanoplastics and microplastics on toxicity, bioaccumulation, and environmental fate of phenanthrene in fresh water. *Environmental Pollution*, 219, 166–173.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.061>
- Mahadevan, G., & Valiyaveetil, S. (123 C.E.). Understanding the interactions of poly(methyl methacrylate) and poly(vinyl chloride) nanoparticles with BHK-21 cell line. *Scientific Reports* |, 11, 2089. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80708-0>
- Patrício, P. S. O., De Sales, J. A., Silva, G. G., Windmüller, D., & Machado, J. C. (2006). Effect of blend composition on microstructure, morphology, and gas permeability in PU/PMMA blends. *Journal of Membrane Science*, 271(1–2), 177–185.  
<https://doi.org/10.1016/J.MEMSCI.2005.06.064>
- Plastic Substitute: Alternative to Glass, Rubber, and Other Materials*. (2018). Thomas For Industry. <https://www.thomasnet.com/articles/plastics-rubber/plastic-substitutes/>
- Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., Papa, F., Rongioletti, M. C. A., Baiocco, F., Draghi, S., D'Amore, E., Rinaldo, D., Matta, M., & Giorgini, E. (2021). Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment International*, 146, 106274.  
<https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.106274>

- Rey, S. F., Franklin, J., & Rey, S. J. (2021). Microplastic pollution on island beaches, Oahu, Hawai'i. *PLOS ONE*, *16*(2), e0247224. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247224>
- Rodríguez-Hernández, A. G., Chiodoni, A., Bocchini, S., & Vazquez-Duhalt, R. (2020). 3D printer waste, a new source of nanoplastic pollutants. *Environmental Pollution*, *267*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115609>
- Rodríguez-Hernández, Ana G., Muñoz-Tabares, J. A., Aguilar-Guzmán, J. C., & Vazquez-Duhalt, R. (2019). A novel and simple method for polyethylene terephthalate (PET) nanoparticle production. *Environmental Science: Nano*, *6*(7), 2031–2036. <https://doi.org/10.1039/c9en00365g>
- Rogers, K. (2020). *microplastics | Definition, Properties, & Plastic Pollution | Britannica*. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/technology/microplastic>
- Rohringer, S. (2021, July 23). *Los mejores filamentos para impresoras 3D de 2021 | All3DP*. ALL3DP. <https://all3dp.com/es/1/filamento-3d-filamento-impresora-3d/>
- Rosevelt, C., Los Huertos, M., Garza, C., & Nevins, H. M. (2013). Marine debris in central California: Quantifying type and abundance of beach litter in Monterey Bay, CA. *Marine Pollution Bulletin*, *71*(1–2), 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.01.015>
- Simon, M., van Alst, N., & Vollertsen, J. (2018). Quantification of microplastic mass and removal rates at wastewater treatment plants applying Focal Plane Array (FPA)-based Fourier Transform Infrared (FT-IR) imaging. *Water Research*, *142*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.019>
- Sobhani, Z., Zhang, X., Gibson, C., Naidu, R., Megharaj, M., & Fang, C. (2020). Identification and visualisation of microplastics/nanoplastics by Raman imaging (i): Down to 100 nm. *Water Research*, *174*, 115658. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115658>
- Solyman, W. S. E., Nagiub, H. M., Alian, N. A., Shaker, N. O., & Kandil, U. F. (2017). Synthesis and characterization of phenol/formaldehyde nanocomposites: Studying the effect of incorporating reactive rubber nanoparticles or Cloisite-30B nanoclay on the mechanical properties, morphology and thermal stability. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, *10*(1), 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2016.12.003>
- Substance Research Centers, H., & Outreach Program, S. (2003). *Environmental Impact of the Petroleum Industry Environmental Update #12*. <http://www.epa.gov/ttn/chief/ap42/ch05/>.
- Sun, Q., Ren, S. Y., & Ni, H. G. (2020). Incidence of microplastics in personal care products: An appreciable part of plastic pollution. *Science of The Total Environment*, *742*, 140218. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.140218>
- Tetakawi. (2020). *Opportunities in Mexico's Plastic Manufacturing Industry*. <https://insights.tetakawi.com/mexicos-plastic-manufacturing-industry>
- Thakur, M. (2021). *Arithmetic Mean Formula | Calculator (Examples With Excel*

- Template). EDUCBA. <https://www.educba.com/arithmetic-mean-formula/>
- The lifecycle of plastics – WWF-Australia - WWF-Australia. (n.d.). Retrieved April 29, 2021, from <https://www.wwf.org.au/news/blogs/the-lifecycle-of-plastics#gs.zzcub5>
- Toor, R. (2019). *The 3D Printing Waste Problem*. <https://www.filamentive.com/the-3d-printing-waste-problem/>
- Uheida, A., Mejía, H. G., Abdel-Rehim, M., Hamd, W., & Dutta, J. (2021). Visible light photocatalytic degradation of polypropylene microplastics in a continuous water flow system. *Journal of Hazardous Materials*, 406, 124299. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124299>
- US Department of Energy. (2019). *Frequently Asked Questions (FAQs) - U.S. Energy Information Administration (EIA)*. Eia. <https://www.eia.gov/tools/faqs/faq.php?id=104&t=3%0Ahttp://www.eia.gov/tools/faqs/>
- Yong, C. Q. Y., Valiyaveetill, S., & Tang, B. L. (2020). Toxicity of microplastics and nanoplastics in Mammalian systems. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(5). <https://doi.org/10.3390/ijerph17051509>
- Zhang, Y., Li, W., Wu, R., & Wang, W. (2017). PU/PMMA composites synthesized by reaction-induced phase separation: a general approach to achieve a shape memory effect. *RSC Advances*, 7(54), 33701–33707. <https://doi.org/10.1039/C7RA05206E>
- Zhu, A. (2019, March 31). *Nanosensors: A Small Step Into The Grand Future | by Andy Zhu | Medium*. Medium. <https://medium.com/@andyzhu200/nanosensors-a-small-step-into-the-grand-future-ae9dfed60733>
- Zubris, K. A. V., & Richards, B. K. (2005). Synthetic fibers as an indicator of land application of sludge. *Environmental Pollution*, 138(2), 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.04.013>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> A) Acumulación de restos de plástico en Barahona, República Dominicana (Fotos por JF) (Rey et al., 2021). B) Cigüeña blanca enredada en una bolsa de plástico (foto por Jhon Cancalos de Natre).....	12
<b>Figura 2.</b> Comparación de tamaños de diferentes elementos en la escala nanométrica (Zhu, 2019).....	13
<b>Figura 3.</b> Estructura química del polímero A) polimetilmetacrilato y B) poliuretano.....	17
<b>Figura 4.</b> Representación gráfica del ordenamiento del ensayo de proliferación (el volumen final de todas las muestras fue de 200 $\mu$ L).....	21
<b>Figura 5.</b> A) Representación gráfica del ordenamiento del ensayo de proteína y B) la curva patrón correspondiente.....	23
<b>Figura 6.</b> A) Representación gráfica del ordenamiento del ensayo de nitritos y B) la curva patrón correspondiente.....	24
<b>Figura 7.</b> Distribución de partículas de la muestra PMMA-PU mediante DLS en A) agua, B) PBS 1X y C) medio DMEM suplementado. ....	27
<b>Figura 8.</b> Análisis de reducción de resazurina vs control de viabilidad celular de la línea HCT15 mediante AlamarBlue a 570 nm, en presencia de diferentes concentraciones de microplástico de PMMA-PU durante las primeras A) 24, B) 48, C) 72, D) 96, E) 120, F) 144 y G) 168 horas. La diferencia no es significativa para * $P > 0.05$ ; si los valores de $P$ son: ** $P \leq 0.05$ ; *** $P \leq 0.01$ ; **** $P \leq 0.001$ ; ***** $P \leq 0.0001$ ; ***** $P \leq 0.00001$ ; ***** $P \leq 0.000001$ , la diferencia es significativa. Todos los ejes X y Y corresponden a lo indicado en el gráfico A.....	29
<b>Figura 9.</b> Imágenes obtenidas con microscopio fluorescente en un ensayo de proliferación por un periodo de tres días.....	30
<b>Figura 10.</b> Ensayo de medición de proteína por medio de BCA y evaluación del cambio en la cantidad de proteína respecto a la proliferación celular.....	33
<b>Figura 11.</b> Medición de la concentración nitritos liberados por un cultivo celular de HCT15 en un periodo de 3 días. La diferencia no es significativa para $\blacktriangle \bullet$ * $P > 0.05$ ; si los valores de $P$ son: $\blacktriangle \blacktriangle \bullet \bullet$ ** $P \leq 0.05$ ; $\blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle \bullet \bullet \bullet$ *** $P \leq 0.01$ ; $\blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle \bullet \bullet \bullet \bullet$ **** $P \leq 0.001$ ; $\blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle \bullet \bullet \bullet \bullet \bullet$ ***** $P \leq 0.0001$ ; la diferencia es significativa. ....	34
<b>Figura 12.</b> Evaluación de absorción de Nitroprusiato de sodio para 1 mg/mL de PMMA-PU en una solución de PBS a una longitud de onda de 395 nm. ....	35
<b>Figura 13.</b> Ensayo de naranja de acridina en un cultivo celular de HCT15 como control positivo por un periodo de 3 días. ....	36
<b>Figura 14.</b> Ensayo de naranja de acridina en un cultivo celular de HCT15 con una concentración de 10 $\mu$ g/mL por un periodo de 3 días.....	37

- Figura 15.** Ampliación de las figuras a) 13D y b) 13B, mostrando la morfología esférica de la línea celular HCT15 después de 48 horas de ensayo..... 38
- Figura 16.** Ampliación de las figuras a) 13G, b) 13H y c) 13I, mostrando la morfología granulada de la línea celular HCT15 después de 72 horas de ensayo. .... 39
- Figura 17.** Imágenes del control positivo de la línea celular de HCT15 obtenidas por microscopio confocal. Las mitocondrias fueron teñidas con MitoID Red (rojo/amarillo), la actina con faloidina 594 (rojo) y los núcleos con Hoeschst 33342 (azul). Todas las imágenes presentan la misma escala mostrada en la figura A. .... 41
- Figura 18.** Imágenes de la concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  de NP's en la línea celular de HCT15 obtenidas por microscopio confocal. Las mitocondrias fueron teñidas con MitoID Red (rojo/amarillo), la actina con faloidina 594 (rojo) y los núcleos con Hoeschst 33342 (azul). Todas las imágenes presentan la misma escala mostrada en la figura A. .... 42