



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN Y
CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE
TEREFTALATO DE POLIETILENO (PET) EN LA
LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE MAMA
HUMANO MDA-MB-231**

T E S I S

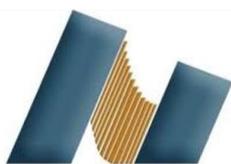
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN NANOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

PERLA SORIA ANGELES

DIRECTORA

DRA. ANA GUADALUPE RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ



ENSENADA, BAJA CALIFORNIA DICIEMBRE 2022.



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
NANOCATÁLISIS

**EVALUACIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN Y
CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE
TEREFTALATO DE POLIETILENO (PET) EN LA LÍNEA
CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE MAMA HUMANO
MDA-MB-231**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
PERLA SORIA ANGELES

DIRECTORA DE TESIS
DRA. ANA GUADALUPE RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA DICIEMBRE 2022

Para mis padres. Gracias por tanto.

~ Agradecimientos ~

Culmino mi etapa universitaria con este trabajo, del cual me enorgullezco por el esfuerzo, la pasión y el empeño con los cuales lo realicé. Agradezco a la Dra. Ana Rodríguez Hernández, por apoyarme y aceptarme en sus proyectos de bionanotecnología, por hacer posible este trabajo y mi crecimiento académico en esta y otras áreas; por ser un modelo ejemplar que me hizo pensar “quiero hacer algo que me haga igual de feliz y que pueda hacerlo tan bien como ella”. Por ser más que una profesora, por todo el cariño, compañía, consejos y amistad que me pudo brindar desde mis primeros días en el CNYN.

Agradezco profundamente a mis padres, Perla Angeles Mendoza y Hugo Soria Montes, por haberme brindado la gran oportunidad que fue estudiar fuera de mi ciudad natal; por haber dejado ir de casa a una niña con la certeza de que dicha decisión era oportuna y tener ahora de regreso a una profesionista. Por haber estado conmigo los 365 días del año, aunque fuera a kilómetros de distancia. Por los valores, costumbres, hábitos y todo el amor que me inculcaron desde que tengo memoria.

A mi hermana, Rubí, por enseñarme las virtudes de paciencia y esfuerzo. Por hacerme una mejor persona y enseñarme lo que es el amor incondicional.

A mi familia y padrinos, por la preocupación y el amor que todos me dieron como si fuera su hija/hermana. Por preocuparse por mí, pero al mismo tiempo tener la certeza de que podría ante la adversidad. Por la calidez y emoción que recibí cada vez que regresaba y por siempre tenerme en mente a pesar de la distancia.

Al Mtro. Ricardo Zúñiga por darme herramientas que me hicieron mejorar en un medio de expresión que amo: la escritura. Gracias Dra. Gaby Guzmán, Dr. Isidro Yocupicio, Dr. Oscar Raymond, Dr. Eduardo A. Murillo y Mstra. Lourdes Serrato, por su excelente desempeño como docentes, que me ayudó a crecer académica y personalmente. Al Dr. Rafael Vázquez, Dr. Oscar González Y Dr. Raul García por revisar este trabajo y dirigirme para su mejora. Gracias a la Dra. Anaid, por todo el conocimiento que compartió conmigo y por la oportunidad de poder unirme a su curso de microbiología. Gracias a Lino, por toda la fortaleza personal que me brindó fuera de la escuela en momentos difíciles.

A mis compañeros de generación, por todas las cosas que aprendí de cada uno, en especial a Tona, Sandy, Pacheco y Juan Carlos, por las risas, los bellos momentos y los buenos deseos que perdurarán en la vida. A Sebastian, por ser mi mayor confidente y apoyarme en mis proyectos personales; por siempre retarme a superarme y darme su mejor versión.

A mi bebé, Duque, por esperarme estos 4 años y recibirme con el amor más sincero de la vida, al igual que a Sir, Lady, Barón y Lobita. A la memoria de Duquesa, que me perdí tus últimos ronroneos y no pude mirar esos ojos azules una última vez. A mis seres amados, de quienes no me pude despedir ni ayer ni jamás... Finalmente, al lector, por no dejar que estas palabras se pierdan en la infinidad

Resumen

A raíz del uso indiscriminado de los plásticos, surge un problema sin precedentes cuyas consecuencias en la flora y fauna a nivel mundial son alarmantes. Desde cambios en los hábitos silvestres hasta la aceleración en la pérdida de especies, son el resultado de décadas de adoptar una cultura de “solo un uso”, donde principalmente materiales plásticos son desechados de manera inadecuada a pesar de estar en perfecto estado y aún cumplir con sus funciones. Entre los plásticos de mayor uso se encuentra el tereftalato de polietileno (PET), el cual tiene un alto impacto en la industria del empaqueo; estos elementos son usados por un corto periodo de tiempo, pero su permanencia en la naturaleza es considerable. Más aún, al someterse a diversos factores degradantes, el plástico no desaparece ni se reintegra a algún ciclo natural, sino que se fragmenta en partículas más pequeñas que persisten en el ambiente. El término microplástico se ha acuñado para referirse a estas partículas, e incluso se denominan nanoplasticos cuando tienen dimensiones nanométricas. Desde hace algunas décadas, el estudio de estas partículas es primordial, ya que debido a su tamaño pueden interactuar a nivel celular y molecular con los organismos, incluyendo al humano. Más aún, la presencia de micro y nanoplasticos en el aire, suelo, agua y diversos alimentos de consumo humano impera determinar las implicaciones de estas partículas en la salud humana. Además, se denota que las mujeres están más expuestas que los hombres a los microplásticos debido al uso de cosméticos y a roles que se les atribuye por cuestión de género, tales como las tareas domésticas.

En este trabajo, se evalúa la internalización y los efectos citotóxicos asociados a nanopartículas de PET en la línea celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 por medio de ensayos de viabilidad celular, liberación de nitritos, ensayo de proteína y microscopías fluorescentes y confocales. Las nanopartículas fueron sintetizadas en el laboratorio con un protocolo que les permite mantener las propiedades del PET y se realizaron diluciones de 10 ng/mL hasta 1 mg/mL. Se encontró que las células son capaces de internalizar estas partículas de manera inmediata mediante procesos endocíticos dependientes de los microfilamentos del citoesqueleto. La interacción prolongada y constante interfirió en las funciones celulares y deterioró su morfología, lo cual condujo a una respuesta apoptótica, sobre todo a altas concentraciones de PET (1 mg/mL). Los daños se denotaron principalmente a las 48 h, con un decremento en la viabilidad celular y con la detención de la proliferación debido a la sobreestimulación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) para todas las concentraciones empleadas; posterior a ello, a largo plazo se presentó un incremento en la viabilidad celular atribuible a hiperplasia. Se encontró que las nanopartículas se alojaron en el citoplasma, zonas perinucleares y en el núcleo, lo cual les permite provocar aberraciones que dan lugar a micronúcleos. Finalmente, se observan características de una respuesta paraptótica, sin embargo, se reconducen estudios futuros para confirmar si sucede esta ruta de muerte celular, así como la mejora en los protocolos empleados para reafirmar la veracidad de los resultados obtenidos en el ensayo de nitritos.

Abstract

The indiscriminate use of plastic causes an unprecedented problem which consequences on flora and fauna worldwide are alarming. There are changes in wild habits and acceleration in the loss of species as a result of decades of adopting the use of “disposable” objects made of plastics, as those materials are disposed of inappropriately despite being in perfect conditions. Among the most widely used plastics is polyethylene terephthalate (PET), which has a high impact on the packaging industry. Packages are used for a short time but their permanence in nature is considerable. Furthermore, plastics do not disappear with degrading factors and they can not reintegrate into some natural cycle as other materials. Rather, they fragment into smaller particles that persist in the environment. The term microplastic has been coined to refer to particles smaller than 5 mm length, and nanoplastic is used for those whose length is smaller than 1 μm . The study of these particles is essential since they can interact at the cellular and molecular level with organisms due to their size. The presence of micro and nanoplastics in the air, soil, water and in food for human consumption prevails to determine the effects of those particles on human health. In addition, it is noted that women are more exposed to microplastics than men because of the use of cosmetics and roles attributed to them based on gender, such as housework.

In this work, we evaluated the internalization and cytotoxic effects associated with PET nanoparticles in the MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cell line. We made viability essays, protein essays, evaluation of nitrite release and fluorescent and confocal microscopies. The nanoparticles were synthesized in the laboratory using a protocol that allows to maintain the properties of PET. We used concentrations from 10 ng/mL to 1 mg/mL. Cells were found to be able to internalize the PET nanoparticles immediately through endocytic processes dependent on microfilaments of the cytoskeleton. The constant interaction between the nanoparticles and the cells altered the morphology and cell functions leading to an apoptotic response, especially at high PET concentration (1 mg/mL). For all the concentrations used, the damages were denoted mainly at 48 h, with a decrease in cell viability and the overstimulation of inducible oxide synthase (iNOS). In the long term there was an increase in cell viability attributable to hyperplasia. It was found that the nanoparticles lodged in the cytoplasm, perinuclear zones, and in the nucleus. This allows them to cause aberrations as micronuclei. Finally, characteristics of paraptotic response are observed. However, future studies are redirected to confirm if this cell death route occurs, as well as the improvement of the protocol of the nitrite essay to reaffirm the veracity of its results.

Índice general

Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Resumen	v
Abstract	vi
Capítulo I: Introducción	1
1.1 Los plásticos	2
1.1.1 Tereftalato de Polietileno (PET)	7
1.2 El uso de plásticos y su impacto ambiental	8
1.3 Generación y presencia de micro y nanoplásticos	14
1.4 Interacción humana con nanopartículas	17
Capítulo II: Antecedentes	17
2.1 Cuestión de género: mujeres sobreexpuestas a microplásticos	20
2.2 Línea celular MDA-MB-231	23
Justificación	23
Hipótesis	23
Objetivos	24
Objetivo general:	24
Objetivos específicos:	24
Capítulo III: Metodología	25
3.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas de PET	25
3.1.1 Dispersión dinámica de luz (DLS)	25
3.2 Evaluación de la toxicidad de las nanopartículas de PET	27
3.2.1 Ensayo de viabilidad y proliferación	28
3.2.2 Ensayo de liberación de nitritos	28

3.2.3 Modelo de nitroprusiato de sodio	31
3.2.4 Detección y cuantificación de proteínas totales	31
3.2.5 Análisis estadístico	33
3.2.6 Tinción de nanopartículas de PET y seguimiento por microscopía fluorescente	33
3.2.7 Seguimiento de partículas de PET por microscopía confocal	34
Capítulo IV: Resultados	37
4.1 Caracterización de nanopartículas de PET	37
4.2 Evaluación de la toxicidad de las nanopartículas de PET	38
4.2.1 Ensayo de viabilidad y proliferación	38
4.2.2 Ensayo de liberación de nitritos	44
4.2.3 Modelo de nitroprusiato de sodio	45
4.2.4 Detección y cuantificación de proteínas totales	46
4.2.5 Seguimiento por microscopía fluorescente	47
4.2.6 Seguimiento de partículas de PET por microscopía confocal	53
Capítulo V: Marco analítico	59
Capítulo VI: Conclusiones	65
Referencias	67
Anexos	81

Índice de figuras

- Figura 1.** Esquema que representa la formación de polietileno a partir de la polimerización de monómero etileno, donde cada esfera representa un átomo. 2
- Figura 2.** Esquema que muestra la clasificación de polímeros según **A)** la estructura de su cadena polimérica. La estructura lineal es la más sencilla, pues se repite el mismo tipo de unión; la estructura de cadena ramificada muestra cadenas laterales unidas a una cadena principal y la cadena entrecruzada se caracteriza por formar enlaces con cadenas vecinas. En este esquema todos los monómeros son del mismo tipo. **B)** Clasificación por el tipo de constituyentes, donde cada color indica un tipo de monómero distinto. 3
- Figura 3.** Representación esquemática de los procesos de polimerización **A)** por adición y **B)** por condensación, donde cada esfera representa un átomo. 4
- Figura 4.** Clasificación de los plásticos y representación de su estructura, donde cada esfera representa un monómero. Las cadenas lineales que conforman a los termoplásticos se ablandan al someterse a altas temperaturas, lo cual permite su modelado. Contrario a esto, las cadenas entrecruzadas de los plásticos termoestables se endurecen al incrementar su temperatura. Los elastómeros presentan una estructura como red de malla con pocos enlaces, lo cual le confiere la capacidad de deformarse elásticamente. 5
- Figura 5.** Código de identificación de los plásticos según **A)** el sistema SPI, **B)** el sistema ASTM y **C)** el símbolo universal de reciclaje. (Adaptación Crawford & Quinn, 2017). 5
- Figura 6.** Esquema de reacciones para la obtención de PET. La esterificación del TA produce DMT, como se muestra en el recuadro inferior izquierdo. El DMT reacciona con el etilenglicol mediante esterificación, para obtener BHET, metanol y agua. El BHET polimeriza mediante reacciones de policondensación, lo cual da como resultado PET y etilenglicol, el cual puede recuperarse para ser usado nuevamente en el proceso de manufactura. 7
- Figura 7.** Producción de materiales plásticos en el mundo y demanda por sector en Europa, 2019 (Adaptación de PlasticsEurope, 2020). 9

- Figura 8.** Recolectores de plástico en un vertedero, Mumbai. El fotógrafo revela que la mujer con tela roja vive en dicho lugar. Imagen por Randy Olson, recuperada desde National Geographic España, 2022. 11
- Figura 9.** Parches de basura alrededor del mundo enumerados por su magnitud. Parche del Océano **1)** Pacífico, **2)** Índico, **3)** Pacífico Sur, **4)** Atlántico Sur y **5)** Atlántico Norte. La masa concentrada en estos parches es mayor en el centro y decrece gradualmente en los límites exteriores, lo cual elimina el concepto de isla de basura al no ser una masa sólida Imagen recuperada desde The Ocean Cleanup, 2022. 12
- Figura 10.** Ejemplo del impacto de los desechos plásticos en la fauna marina (**A-B**) y terrestre (**C-D**). **A)** Mantarraya intentando filtrar su alimento del plástico que flota a su alrededor. Imagen por Lori Pyke. **B)** Tortuga atrapada en una red. Imagen por Jordi Chias. **C)** Hienas en busca de alimento en un vertedero, Etiopía. Imagen por Brian Lehmann. Recuperadas desde National Geographic España, 2022. **D)** Lobo con recipiente de plástico en la cabeza, Nagpur. Imagen por Tanay Panpalia. Recuperada desde ABC Natural, 2018. 13
- Figura 11.** Microplásticos primarios (izquierda) y secundarios (derecha). Imágenes recuperadas desde Aliexpress y National Geographic España, 2022. 15
- Figura 12.** Fragmentos de plástico, ordenados de mayor a menor tamaño, que se encontraron en el estómago de un polluelo albatros después de matarlo. Imagen por Mandy Barker. Recuperada desde National Geographic España, 2022. 16
- Figura 13.** Vías de exposición humana a microplásticos; órganos y tejidos donde se ha demostrado bioacumulación y efectos relacionados que se han explorado en la literatura. (Elaboración propia. Información de Yuan et al., 2022⁺; Zarus et al., 2020[‘]; Bhuyan, 2022[^]; Wright & Kelly, 2017^{*}; Prata, 2018[°]). 19
- Figura 14.** Ilustración que ejemplifica la sobreexposición del género femenino a microplásticos, sobre todo de microplásticos primarios en diversos productos de higiene y cosméticos, entre otros. 20
- Figura 15.** **A)** Ilustración que ejemplifica los cambios en la intensidad de dispersión por las condiciones de interferencia de partículas pequeñas y grandes, las cuales muestran una tasa de difusión o variación de la intensidad de dispersión rápida y lenta correspondientemente. **B)** Concepto de radio hidrodinámico. **C)** Esquema sobre la formación de coronas en las partículas. 26

- Figura 16.** Distribución de la curva de referencia de dióxido de nitrógeno para el ensayo de nitritos y de las muestras con partículas de PET en una placa de 96 pocillos. 30
- Figura 17.** Distribución de la curva de referencia de BSA para el ensayo de proteína y de las muestras sonicadas en una placa de 96 pocillos. 32
- Figura 18.** **A)** Diagrama del sistema de un equipo de microscopía confocal; las flechas representan la filtración y el reflejo de la luz láser que impacta con el espécimen en el plano correspondiente al corte óptico que se está analizando. **B)** Esquema que representa el tipo de imágenes que se pueden obtener al analizar las muestras en diferentes planos focales; la ilustración representa una célula fijada en un portaobjetos, con el núcleo teñido de azul, el citoesqueleto de verde y una partícula sintética de color rojo. Por su posición, se determina que la partícula se encuentra dentro de la célula, en la parte inferior. 34
- Figura 19.** Distribución de tamaño obtenidos por triplicado mediante DLS para los diferentes medios que se emplearon. Con color gris se exhiben los controles y con color negro, los medios con nanopartículas de PET. 81
- Figura 20.** Resultado colorimétrico de un ensayo de viabilidad celular de 3 días con reactivo AlamarBlue®. 82
- Figura 21.** Gráficas que representan la viabilidad de células MDA-MB-231 en presencia de nanopartículas de PET en concentraciones que van desde 1 mg/mL hasta 10 ng/mL durante **A)** 24 h, **B)** 48 h, **C)** 72 h, **D)** 96 h, **E)** 120 h, **F)** 144 h y **G)** 168 h. Los datos contienen SD con $n = 3$. Los símbolos * denotan diferencias significativas con $p < 0.05$ respecto a C+, mediante ANOVA y método Tukey. 39
- Figura 22.** Esquemas del cambio del porcentaje de viabilidad celular que tuvieron en 7 días las células MDA-MB-231 expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de PET: **A)** 1 mg/mL, **B)** 100 μ g/mL, **C)** 10 μ g/mL, **D)** 1 μ g/mL, **E)** 100 ng/mL y **F)** 10 ng/mL. Las gráficas se encuentran normalizadas respecto a C+ y contienen SD con $n = 3$. Los símbolos * denotan diferencias significativas con $p < 0.05$ respecto a C+, mediante ANOVA y método Tukey. 41
- Figura 23.** Micrografías obtenidas por microscopía fluorescente que representan la morfología de las células MDA-MB-231 durante 3 días en incubación con 37°C y atmósfera de 5% CO₂ en condiciones **A)** normales sin nanopartículas (C+) y **B)** con DMSO sin nanopartículas (C-). En las demás micrografías se denotan los cambios morfológicos que tienen con 83

la adición de nanopartículas en concentraciones de **C)** 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y **D)** 100 ng/mL .

- Figura 24.** Micrografías obtenidas por microscopía fluorescente a 10x donde se exhiben los cambios morfológicos de las células MDA-MB-231 por un periodo de 3 días en presencia de nanopartículas de PET en concentraciones de **A)** 1 mg/mL , **B)** 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, **C)** 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y **D)** 10 ng/mL . Los recuadros negros son indicativos para células cuya membrana se ve rodeada por partículas de PET, mientras que los círculos exhiben células con vesículas de gran tamaño o con alteración en la morfología de su membrana plasmática. 42
- Figura 25.** Curvas de respuesta para **A)** ensayo de nitritos y **B)** ensayo de proteínas obtenidos por espectrofotometría. En las gráficas se puede observar el ajuste lineal correspondiente a cada ensayo, así como su coeficiente de determinación R^2 . 83
- Figura 26.** Gráficas de liberación de nitritos por células MDA-MB-231 expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de PET por un periodo de 3 días. Los datos se obtuvieron por espectrofotometría y contienen SD con $n = 3$. Los símbolos * denotan diferencias significativas con $p < 0.05$ respecto a C+, mediante ANOVA y método Tukey. 44
- Figura 27.** Datos obtenidos mediante espectrofotometría que representan el comportamiento del nitroprusiato de sodio ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) al estar expuesto a nanopartículas de PET por un periodo de 7 días en una solución de PBS 1X. 45
- Figura 28.** Datos obtenidos mediante espectrofotometría sobre cuantificación de biomasa a través de un ensayo de proteínas BCA para células MDA-MB-231 expuestas a 10 ng/mL de nanopartículas de PET y sin tratamiento (C+) por 3 días. 46
- Figura 29.** Micrografías obtenidas por microscopía fluorescente a 10x donde se exhiben los cambios morfológicos que las células MDA-MB-231 experimentan durante las primeras 48 h y hasta las 120 h de exposición a nanopartículas de PET de concentración de 1 mg/mL . En rojo se denotan las nanopartículas de PET teñidas con rojo Nilo mientras que en verde se denota el citoesqueleto de las células MDA-MB-231. Los hexágonos que se aprecian en la figura A son indicativos para células que tienen nanopartículas de PET en su interior a partir de las 0 h de exposición. El recuadro señala una célula que parece estar fagocitando una partícula de PET y el círculo señala células con vesículas de gran tamaño en su interior, las cuales se señalan con blanco en sus respectivas micrografías 48

fluorescentes. Asimismo, se observan grandes agregados de partículas de PET con un tamaño de hasta 132 μm .

- Figura 30.** Ídem anterior. Los recuadros indican una célula con forma particular, la cual se presume que trata de engullir las partículas de PET que se encuentran a su alrededor y el círculo denota una célula con vesículas de gran tamaño. Las figuras 29 y 30 corresponden a la misma caja de Petri donde se llevó a cabo el seguimiento mediante microscopía fluorescente durante 5 días, siendo representativas de diferentes zonas cada una. 49
- Figura 31.** Micrografías obtenidas por microscopía fluorescente a 40x que representan el comportamiento de las células MDA-MB-231 expuestas a nanopartículas de PET teñidas con rojo Nilo. Las micrografías en señal verde denotan el citoesqueleto de las células, mientras que la señal roja se usó para rastrear a las nanopartículas de PET. Estas micrografías son representativas del comportamiento que se observó para esta zona de la muestra en hora y media de seguimiento, a 37°C y sin atmósfera de CO₂. 51
- Figura 32.** Ídem anterior. Se observa que la célula marcada con el #2 alarga prolongaciones de su membrana para engullir partículas de PET. Las figuras 31 y 32 corresponden a la misma caja de Petri donde se llevó a cabo el seguimiento por medio de microscopía fluorescente durante hora y media, siendo representativas de diferentes zonas cada una y donde las micrografías en señal verde y roja corresponden a las micrografías de señal blanca posicionadas en las partes superiores. 52
- Figura 33.** Micrografías obtenidas por microscopía fluorescente a 40x de células MDA-MB-231 expuestas a nanopartículas de PET teñidas con rojo Nilo en concentración de 10 mg/mL sobre un cubreobjetos funcionalizado con Poli-L-lisina al 10% en PBS 1X. En verde se denota el citoesqueleto de las células, mientras que en rojo las nanopartículas de PET. Las micrografías de **A)** y **B)** son representativas del comportamiento de las células en dos zonas diferentes del mismo ensayo, al cual se le dio seguimiento durante 1 h a 37°C y con una atmósfera con 5% CO₂. Se recalca que las partículas de PET muestran fluorescencia tanto en señal verde como en roja. 54
- Figura 34.** Micrografías obtenidas por microscopía confocal con magnificación de la lente objetivo a 60x que demuestra la presencia de micronúcleos en células MDA-MB-231 que interactuaron con nanopartículas de PET por 1 h. Se exhiben A) las nanopartículas de PET teñidas con rojo Nilo (rojo), B) núcleos celulares teñidos con DAPI (azul), C) citoesqueleto de las 55

células correspondiente a GFP (verde), D) combinación de imágenes fluorescentes y E) combinación con campo claro.

Figura 35. Micrografías obtenidas por microscopía confocal con magnificación de la lente objetivo a 60x que exhiben el resultado de la interacción de células MDA-MB-231 con nanopartículas de PET por 1 h. Se muestran **A)** las nanopartículas de PET teñidas con rojo Nilo (rojo), **B)** los núcleos celulares teñidos con DAPI (azul) y **C)** el citoesqueleto de las células en verde, correspondiente a la GFP acoplada a esta línea celular. De igual manera se muestran **D)** las combinaciones de imágenes fluorescentes y **E)** la combinación con campo claro. Cada fila representa una zona diferente de la misma muestra examinada. 56

Figura 36. Micrografías obtenidas por microscopía confocal con magnificación de la lente objetivo a 60x que exhibe la internalización de nanopartículas de PET por células MDA-MB-231 después de su interacción durante 1 h. **A)** Nanopartículas de PET teñidas con rojo Nilo (rojo), **B)** núcleo celular teñido con DAPI (azul), **C)** cadherinas teñidas con anti-N-cadherina Alexa Fluor 546 ® (rojo), **D)** citoesqueleto en verde, atribuido a la GFP que expresa esta línea celular, **E)** micrografía en campo claro, así como combinación de imágenes fluorescentes **F)** núcleo, nanopartículas de PET y citoesqueleto y **G)** núcleo, nanopartículas de PET y cadherinas. Se señala con una flecha blanca una porción del cuerpo celular cuya membrana parece estar alterada debido a la falta de fluorescencia en dicha zona. 57

Índice de tablas

Tabla 1.	Códigos de identificación de los plásticos y sus principales aplicaciones (Crawford & Quinn, 2017; Fundación Heinrich Böll, 2019).	6
Tabla 2.	Tiempo aproximado de degradación para objetos plásticos desechables de uso cotidiano. (Adaptación de SEMARNAT, 2018)	10
Tabla 3.	Tipos de degradación a los que se ven expuestos los plásticos (Posada Bustamante, 1994; Gutiérrez Pescador, 2013; Cristán Frías et al., 2003).	14
Tabla 4.	Resumen de investigaciones que denotan los efectos adversos de microplásticos y nanopartículas en ratones hembra preñadas y en etapa de lactancia.	21
Tabla 5.	Descripción de isoformas de NOS. La nomenclatura se describe a partir del orden de purificación de la enzima (Cuéllar Mata et al., 2010; Elíes Gómez, 2009).	29
Tabla 6.	Parámetros de excitación y emisión de los marcadores empleados para identificar los componentes celulares y las partículas de PET.	36
Tabla 7.	Tamaño (diámetro hidrodinámico) y potencial Z de los medios empleados en los experimentos sin y con nanopartículas de PET en su contenido. Los datos son reportados como valores promedio \pm SD (n=3). Los medios suplementados contienen 1% antibiótico-antimicótico y 10% SFB.	37

Capítulo I: Introducción

Los plásticos son los materiales de mayor uso en los distintos sectores de la industria y en la vida cotidiana; prácticamente cualquier objeto puede encontrarse elaborado a partir de estos materiales. A partir de 1940 los plásticos comenzaron a comercializarse a gran escala, pues sus propiedades satisfacen las limitaciones que los materiales naturales, cerámicos y metálicos suponen (Schirinzi et al., 2017; García, 2009). Estos materiales son ligeros, resistentes y su producción es barata, por lo que se convirtieron en una parte fundamental para la sociedad, dando paso a la evolución tecnológica y revolucionando el mundo moderno.

Las cualidades de estos materiales han llevado al auge su producción durante el siglo XX, cuya tendencia continúa hoy en día; desde entonces, la producción de plástico ha incrementado exponencialmente para mantenerse al día con la demanda. Se estima que entre 1950 y 2007 se han producido 9.2 mil millones de toneladas de este material y se aproxima que cada año se producen más de 400 millones de toneladas (Fundación Heinrich Böll, 2019). En un inicio, la producción mundial de plástico era de 1.5 millones de toneladas (Crawford & Quinn, 2017). El crecimiento de la demanda de plástico ha sido tal que al menos la mitad de todo el plástico que se ha producido hasta ahora ha sido fabricado a partir del año 2005; los pronósticos indican que para 2025 se fabricarán más de 600 millones de toneladas y para 2050 de 850 a 1,124 millones de toneladas (Fundación Heinrich Böll, 2019).

Los objetos plásticos se encuentran en todos lados y es casi inevitable no emplearlos. Si bien sus características son bastante atractivas, estas mismas son las que hacen que este material conduzca hacia importantes problemas ambientales, ya que resiste la degradación y persiste en el ambiente. La acumulación de este material es evidente, pues podemos encontrar una vasta cantidad de plástico formando parte de diversos paisajes alrededor del mundo. El problema radica en que ahora se trata al plástico como un material sin valor propio y no existe una adecuada gestión de estos residuos. Para inicios de 1960, millones de artículos plásticos se encontraban en los basureros a pesar de que la idea original era usarlo como un material de alta calidad (Fundación Heinrich Böll, 2019).

El reporte Libera (2019) indica que aproximadamente un 79% de todo el plástico que el ser humano ha producido en todo el mundo sigue acumulado en vertederos o contaminando entornos naturales. El incremento de desechos plásticos es incuestionable y cada día son más perceptibles los efectos que supone el abandono de plásticos en los distintos ecosistemas. Su acumulación ha creado un nuevo problema ambiental sin precedentes, pues ahora es imposible hacer frente a la enorme cantidad de residuos plásticos que amenazan a la flora y fauna a nivel global (PNUMA, 2018).

La mayoría de los plásticos que se comercializan hoy en día resisten diversos fenómenos de degradación, aun cuando se encuentran a la intemperie; la degradación de los plásticos es lenta, y al estar sometidos a diversas condiciones climáticas estos se fragmentan en trozos más

pequeños. Estos fragmentos pueden alcanzar dimensiones milimétricas o incluso nanométricas, lo cual hace más difícil su extracción del medio ambiente. Los micro y nanoplásticos han sido el blanco de investigaciones en las últimas décadas, ya que su tamaño les permite interactuar de distintas formas con los organismos acuáticos, terrestres y con otras sustancias. El resultado de estas interacciones aún no se sabe con precisión, sin embargo, sus características apuntan a que pueden tener un impacto perjudicial en la salud de los organismos.

1.1 Los plásticos

El siglo XX es denominado como el siglo de los plásticos, ya que este material entró en auge volviéndose el componente más utilizado para la creación de diversos objetos en todas las industrias (Libera, 2019). El término plástico, que proviene del griego *plastikos*, se empleó por primera vez en 1630, haciendo alusión a una sustancia que muestra la capacidad de ser modelada fácilmente (Crawford & Quinn, 2017); hoy en día esta palabra es empleada para describir un grupo de materiales fabricados a partir de materias primas orgánicas tales como hidrocarburos o recursos de origen biológico (CONMEXICO, 2020).

La capacidad de moldeo de estos materiales se relaciona con su composición, la cual consta de moléculas de gran tamaño, conocidas como macromoléculas. Como se observa en la figura 1, las macromoléculas se forman por la unión de unidades más pequeñas que se repiten, denominadas monómeros, donde el prefijo *mono* se emplea para denotar una unidad única. Los monómeros son moléculas que poseen átomos de carbono unidos entre sí mediante enlaces covalentes (Crawford & Quinn, 2017; Hermida, 2011). Con el tiempo se ha acuñado el término polímero para describir a las sustancias que tienen esta disposición molecular y el proceso por el cual se unen los monómeros es conocido como polimerización (Crawford & Quinn, 2017).

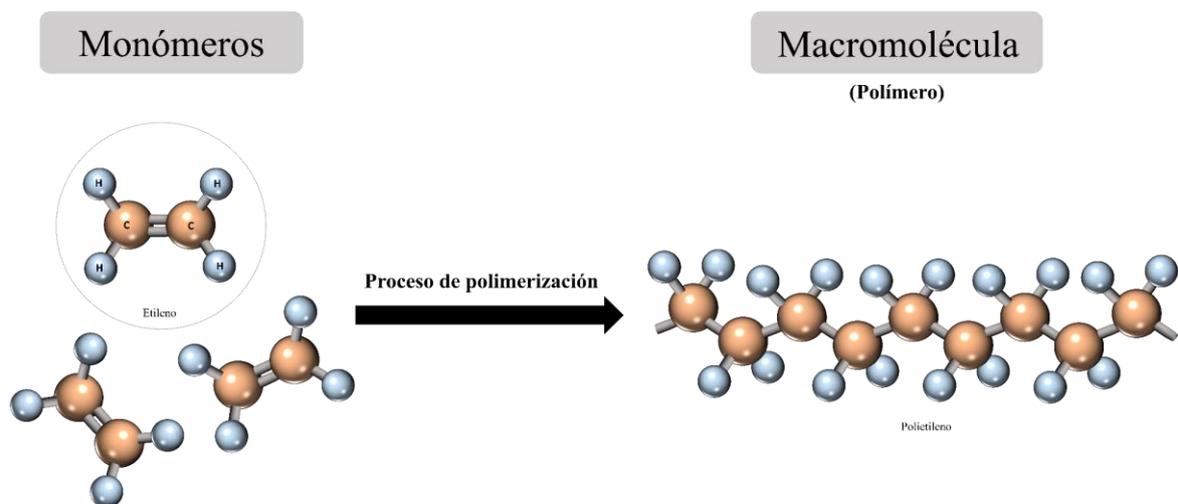


Figura 1. Esquema que representa la formación de polietileno a partir de la polimerización de monómero etileno, donde cada esfera representa un átomo.

Los polímeros se clasifican según su origen, su uso o por la estructura que tengan las cadenas que forman las macromoléculas. De acuerdo con su origen, pueden ser naturales o sintéticos, cuya diferencia es la intervención del hombre para su obtención. Los naturales son aquellos producidos por organismos vivos, tales como el caucho natural, los polisacáridos, el ADN, el algodón, el polihidroxibutirato, entre muchos otros. Los sintéticos son macromoléculas creadas por el hombre, quien ha desarrollado métodos para controlar la estructura de la cadena polimérica y así brindar ciertas características y propiedades al material resultante (Hermida, 2011). La estructura de la cadena polimérica puede ser lineal, ramificada o entrecruzada, como muestra la figura 2A, y dependiendo del tipo de monómeros que se empleen se puede clasificar en *homopolímeros*, si es que todos los monómeros constituyentes son iguales, o en *copolímeros*, si los constituyentes son monómeros diferentes, como lo muestra la figura 2B.

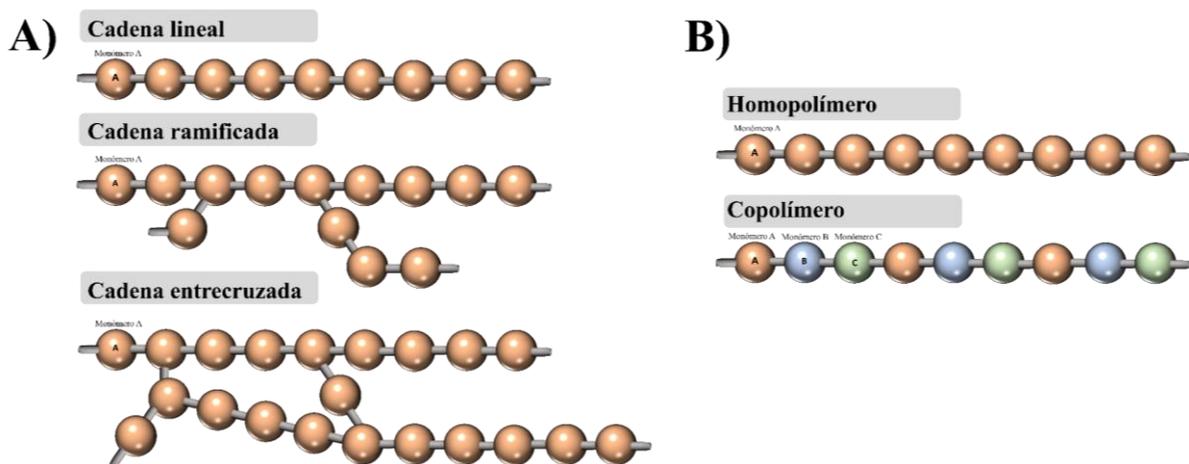


Figura 2. Esquema que muestra la clasificación de polímeros según **A)** la estructura de su cadena polimérica. La estructura lineal es la más sencilla, pues se repite el mismo tipo de unión; la estructura de cadena ramificada muestra cadenas laterales unidas a una cadena principal y la cadena entrecruzada se caracteriza por formar enlaces con cadenas vecinas. En este esquema todos los monómeros son del mismo tipo. **B)** Clasificación por el tipo de constituyentes, donde cada color indica un tipo de monómero distinto.

Los procesos de polimerización para la síntesis de polímeros sintéticos pueden clasificarse en dos tipos: de adición y de condensación. La polimerización de adición es característica para monómeros que tienen doble enlace carbono-carbono; los radicales libres, iones o complejos metálicos que se forman durante el proceso son transitorios y no se pueden aislar (Cienciasfera, 2012; Hermida, 2011). En pocas palabras, los polímeros se forman por la adición de monómeros de manera repetitiva como se muestra en la figura 3A. Por otra parte, la polimerización por condensación se produce por reacciones entre moléculas que poseen grupos funcionales; en este proceso los monómeros reaccionan y se combinan por medio de la eliminación de moléculas pequeñas (Cienciasfera, 2012; Hermida, 2011), como muestra la figura 3B.

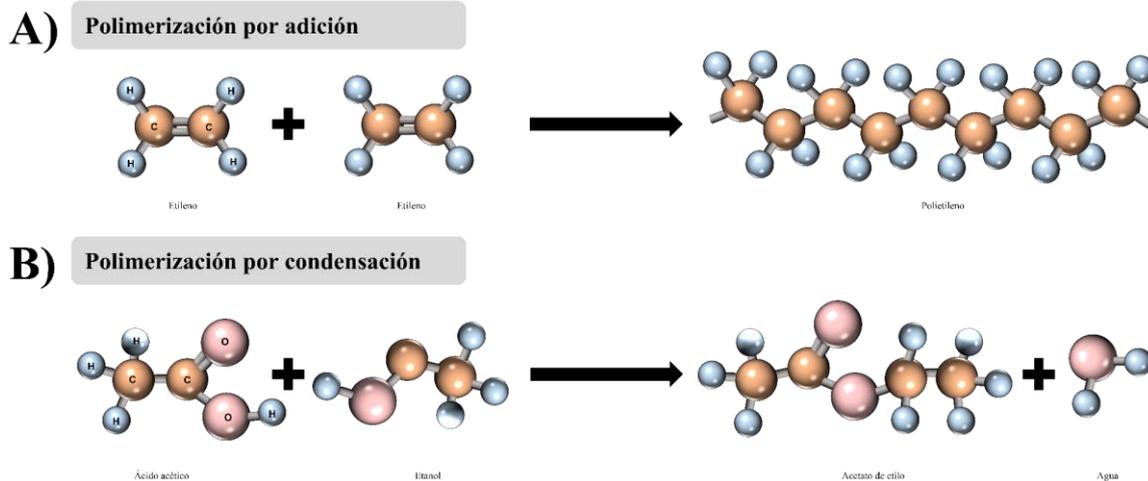


Figura 3. Representación esquemática de los procesos de polimerización **A)** por adición y **B)** por condensación, donde cada esfera representa un átomo.

Los diferentes tipos de polimerización dan lugar a diferentes tipos de plásticos y se suele añadir aditivos químicos en el proceso para mejorar sus propiedades, de tal manera que se pueden obtener plásticos duros, blandos, flexibles, rígidos, transparentes u opacos que tendrán diversas aplicaciones (Fundación Heinrich Böll, 2019). Las características más populares de los plásticos son su ligereza, bajo costo de producción y resistencia a la corrosión; asimismo, los materiales plásticos muestran elasticidad, bajo coeficiente de fricción y son buenos aislantes térmicos, eléctricos y acústicos (SEMARNAT, 2020). Aunque sus propiedades son muy atractivas, como cualquier otro material, su uso tiene limitaciones. En general, los plásticos presentan baja resistencia a temperaturas altas y a los rayos UV; son inflamables, presentan poca dureza superficial, son propensos a quebrarse a bajas temperaturas y con el calor pueden expandirse de tres a diez veces más en comparación con los metales (SEMARNAT, 2020). Es importante destacar que los polímeros son simplemente cadenas largas formadas por la repetición de varios monómeros y si bien todos los plásticos son polímeros, no todos los polímeros son plásticos (Crawford & Quinn, 2017).

Los plásticos también se pueden clasificar según su respuesta termo-mecánica como termoplásticos, termoestables y elastómeros. Los *termoplásticos* tienen una estructura de cadena lineal y permiten su modelado a altas temperaturas sin que se modifique la naturaleza de sus enlaces, de tal manera que se pueden procesar varias veces sin que se vea alterada su composición química (Hermida, 2011). Los *termoestables* o termorrígidos muestran una estructura de cadena entrecruzada cuyos enlaces se degradan al elevar su temperatura, por lo que estos materiales no pueden reprocesarse después de que se conforman; finalmente, los *elastómeros* tienen la capacidad de experimentar deformación elástica a temperatura ambiente gracias a que los monómeros se unen formando enormes cadenas que se alinean al ser sometidas a un esfuerzo y regresan a su forma original cuando éste cesa (Madrigal Guzmán & Shastri, 2011). Las estructuras mencionadas anteriormente se muestran en la figura 4.

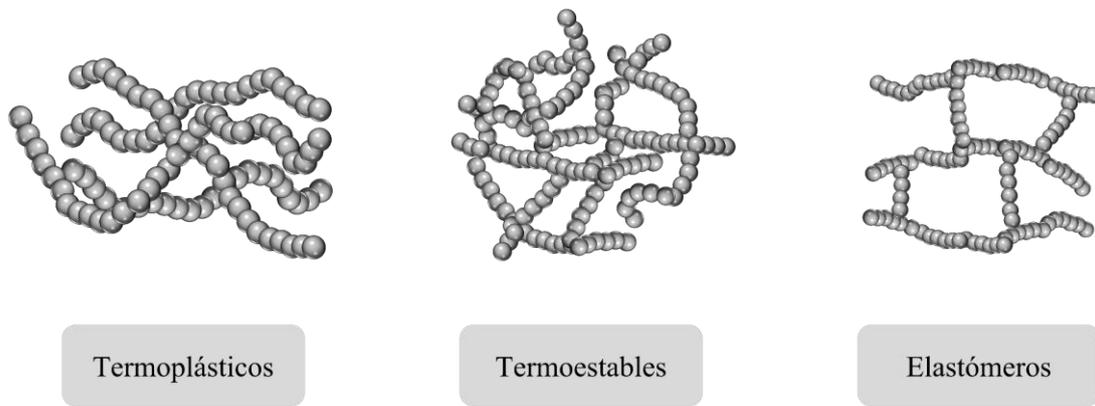


Figura 4. Clasificación de los plásticos y representación de su estructura, donde cada esfera representa un monómero. Las cadenas lineales que conforman a los termoplásticos se ablandan al someterse a altas temperaturas, lo cual permite su modelado. Contrario a esto, las cadenas entrecruzadas de los plásticos termoestables se endurecen al incrementar su temperatura. Los elastómeros presentan una estructura como red de malla con pocos enlaces, lo cual le confiere la capacidad de deformarse elásticamente.

Además de esta clasificación, la rápida comercialización de plásticos supuso la necesidad de adoptar un código que permitiera identificar y separar los plásticos fácilmente. En 1988, la Sociedad de la Industria de Plásticos (SPI, por sus siglas en inglés) propuso clasificar los termoplásticos en siete categorías (ver figura 5A); dicha clasificación ha sido adoptada para su uso en México desde 1999 (SEMARNAT, 2020). En 2013, la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM, por sus siglas en inglés) decidió retirar el triángulo conformado por tres flechas que se persiguen y reemplazarlas por triángulos sólidos, ya que se generaba confusión al asemejar los códigos con el símbolo universal de reciclaje, como se observa en las figuras 5B y 5C correspondientemente. A pesar de que el sistema SPI es recomendado por la Federación Británica de Plásticos y por Plastics Europe, la ASTM argumenta que su código emplea símbolos para identificar el tipo de plástico y no su capacidad de ser reciclados (Crawford & Quinn, 2017).

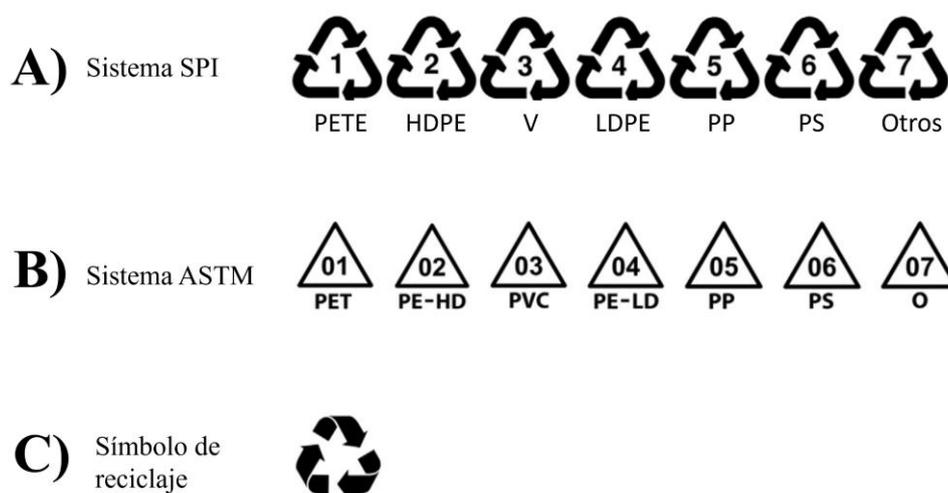


Figura 5. Código de identificación de los plásticos según **A)** el sistema SPI, **B)** el sistema ASTM y **C)** el símbolo universal de reciclaje. (Adaptación Crawford & Quinn, 2017).

Gracias a la globalización, se podría encontrar cualquiera de estos códigos y sus variaciones en productos importados a México. Las aplicaciones que cada plástico tiene, así como el significado de las abreviaturas que se identifican en los códigos se describen en la siguiente tabla.

Tabla 1. Códigos de identificación de los plásticos y sus principales aplicaciones (Crawford & Quinn, 2017; Fundación Heinrich Böll, 2019).

Código de la SPI	Tipo de plástico	Abreviación	Principales aplicaciones
	Polietileno tereftalato	PET o PETE	Películas y láminas plásticas, envoltorios, botellas para bebidas, material de relleno y empaçado de alimentos.
	Polietileno de alta densidad	HDPE	Contenedores de productos químicos, cañerías y tuberías, artículos para el hogar y contenedores de comida.
	Policloruro de vinilo	PVC o V	Botas, cortinas, cañerías, revestimiento de cables eléctricos, mangueras, revestimiento para pisos, envases, calzado e imitación de cuero
	Polietileno de baja densidad	LDPE	Bolsas plásticas, bolsas de basura, envasado de alimentos, revestimientos de cartón, muebles para exteriores y botellas comprimibles.
	Polipropileno	PP	Empaques de alimentos, tapas de botellas y contenedores, interiores de vehículos, tuberías y muebles para exteriores.
	Poliestireno	PS	Envolturas y contenedores de alimentos, cubiertos y vajillas desechables, y materiales de empaçado.
	Diversos plásticos (PC, PA, PMMA, PUR, ABS, ASA, SAN)	Otros	Maletas, juguetes, cerdas de cepillos de dientes, envases, ropa, cuerdas, CDs y DVDs, entre otros.

De acuerdo con sus aplicaciones y características, algunos plásticos son más difíciles de reciclar que otros (Greenpeace México, 2019). Por ejemplo, reciclar plásticos que han sido

degradados o decolorados por el sol no es factible debido a que su composición química ha sido alterada y se ha perdido la calidad del material original; tampoco se pueden reciclar plásticos que estén mezclados con otros materiales, tales como metales, resinas o adhesivos. El color también influye, pues los pigmentos empleados podrían dañar las máquinas de reciclaje y alterar las producciones posteriores. Además, algunos plásticos requieren procedimientos químicos que facilitan el desprendimiento de partículas tóxicas, aunado a un alto costo e ineficiencia (Greenpeace México, 2019). Por otra parte, no existen leyes ni regularizaciones que controlen la producción o el consumo excesivo de plástico. De hecho, se estima que se ha reciclado solo el 10% de las aproximadamente 9.2 mil millones de toneladas de plásticos que se han fabricado hasta la actualidad (Fundación Heinrich Böll, 2019).

1.1.1 Tereftalato de Polietileno (PET)

El tereftalato de polietileno, también conocido como polietileno tereftalato (PET, por sus siglas en inglés) es un poliéster que se obtiene a partir de reacciones de polimerización por condensación del etilenglicol y el ácido tereftálico (TA), los cuales son derivados del petróleo (Cobos, 2016; Yoshida et al., 2016). La figura 6 representa las reacciones y los compuestos químicos que se necesitan y que se obtienen en la producción de este material. En la industria se pueden utilizar dos moléculas para la producción del monómero tereftalato de bis-hidroxietila (BHET), las cuales son TA o dimetil tereftalato (DMT); la razón es que, a partir de la esterificación del TA, llevada a cabo con metanol y un catalizador de cobalto, se obtiene DMT. El DMT se somete nuevamente a un proceso de esterificación con el etilenglicol y se obtiene el monómero BHET, metanol y agua. Finalmente, el BHET reacciona mediante policondensación a temperaturas mayores a 250°C, dando como productos PET y etilenglicol (Cobos, 2016; Suasnavas Flores, 2017).

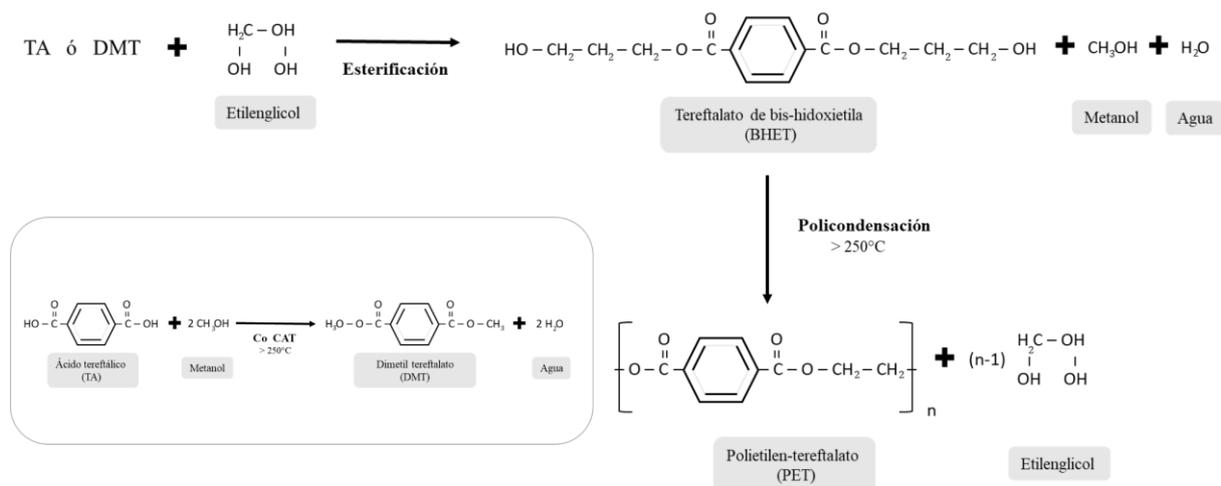


Figura 6. Esquema de reacciones para la obtención de PET. La esterificación del TA produce DMT, como se muestra en el recuadro inferior izquierdo. El DMT reacciona con el etilenglicol mediante esterificación, para obtener BHET, metanol y agua. El BHET polimeriza mediante reacciones de policondensación, lo cual da como resultado PET y etilenglicol, el cual puede recuperarse para ser usado nuevamente en el proceso de manufactura.

Las características del PET incluyen una estructura lineal, resistencia química, es impermeable, liviano, inerte al contenido, resistente al desgaste al tener alta dureza y rigidez, es reciclable, tiene buenas propiedades como aislante térmico, es insoluble en solventes orgánicos y actúa como barrera contra oxígeno, dióxido de carbono, radiación UV y contra la humedad (Arapack, 2018; Suasnavas Flores, 2017). Dependiendo de la velocidad de enfriamiento después de su conformación, el PET puede ser parcialmente cristalino o amorfo, lo cual se ve reflejado en su transparencia y densidad, la cual oscila entre 1.33 - 1.51 g/cm³ (Suasnavas Flores, 2017). Más aún, debido a la cantidad de componentes aromáticos que tiene, el PET resiste la degradación microbiana, es decir, no es biodegradable, de tal manera que conserva sus características a lo largo del tiempo (Yoshida et al., 2016; Suasnavas Flores, 2017). Por otra parte, la fotodegradación, en especial la acción de la radiación UV, sí es capaz de romper los enlaces poliméricos del PET, dando como resultado fragmentos más pequeños en un proceso lento (Suasnavas Flores, 2017).

Entre los plásticos más consumidos a nivel mundial, destacan el polietileno (PE), el polipropileno (PP) y el PET (Fundación Heinrich Böll, 2020). En 2016, Yoshida y colaboradores estimaron una producción anual de 50 millones de toneladas de PET a nivel mundial. Actualmente el sector con mayor demanda de PET es el de envasado y embalaje, aunque también tiene aplicación en el sector automotriz, electrónico, en la agricultura, entre otros (PlasticsEurope, 2020). El uso masivo del PET inició en la década de 1990 y hoy en día, en México, es uno de los materiales que predomina en la composición de los residuos nacionales (Suasnavas Flores, 2017; Fundación Heinrich Böll, 2020).

1.2 El uso de plásticos y su impacto ambiental

A lo largo de la historia se descubrieron sustancias plásticas naturales, tales como el caucho, el ámbar, la celulosa y el látex. Por ejemplo, en el año 2000 a.C los egipcios usaban resinas naturales para embalsamar y momificar a los muertos y años más tarde los mayas usaban caucho natural para obtener una pasta que les servía para confeccionar su calzado o sellar vasijas (García, 2009; SEMARNAT, 2020). El origen de los plásticos sintéticos podría remontarse a 1862 cuando Alexander Parkes presentó la *parkesina*, un material fabricado a partir de celulosa que podía ser modelado al calentarse y mantener su forma al enfriar (Fundación Heinrich Böll, 2019). Este plástico fue elaborado a partir de materias primas naturales con intervención del hombre y fue hasta 1907 cuando Leo Hendrik Baekeland creó la *baquelita*, el primer plástico sintético termoestable que no empleaba productos naturales para su fabricación (SEMARNAT, 2020).

La Revolución Industrial y la Segunda Guerra Mundial fueron hechos imprescindibles para la popularización de los materiales plásticos: el aumento de población, la búsqueda de calidad de vida en las ciudades, la automatización e industrialización, el uso de energía derivada de combustibles fósiles y la necesidad de obtener materia prima u objetos a buen costo provocó un aumento en la producción de plástico y mejoras en su calidad (Fundación Heinrich Böll, 2019; Góngora Pérez, 2014). Además, la invención del microondas y los refrigeradores dio

paso a la comercialización de alimentos precocidos, lo cual fue clave para la introducción del plástico en el sector alimentario como empaque y artículo de un solo uso. Hoy en día, más del 60% de los alimentos que se comercializan están recubiertos por empaques plásticos (Gómez Serrato, 2016).

La producción de materiales plásticos fácilmente podría superar la de cualquier otro material, ya que los beneficios que estos suponen son indiscutibles (PNUMA, 2018). La versatilidad de estos materiales propicia su uso ya sea como parte de los procesos productivos o para la elaboración de productos finales; además, su producción y manufactura consume menos energía en comparación con el vidrio o los metales (Madrigal Guzmán & Shastri, 2011; Connell, 2021). Actualmente, los plásticos ya no son vistos como materiales sustitutos y el desarrollo de tecnologías que aprovechan sus bondades para la creación de productos nuevos va en aumento (Góngora, 2014). La demanda de este material provocó que en 2015 se fabricaran 407 millones de toneladas a nivel mundial para su aplicación en diferentes sectores (Fundación Heinrich Böll, 2019; Libera, 2019). El reporte de PlasticsEurope (2020) señala que en 2019 se produjeron 368 millones de toneladas de plásticos en el mundo, siendo Asia responsable de aproximadamente la mitad de la producción mundial de plásticos. De la misma manera, se indica que el consumo de Europa en el mismo año fue de 50,7 millones de toneladas de plástico, los cuales son empleados en diferentes sectores como lo muestra la figura 7.

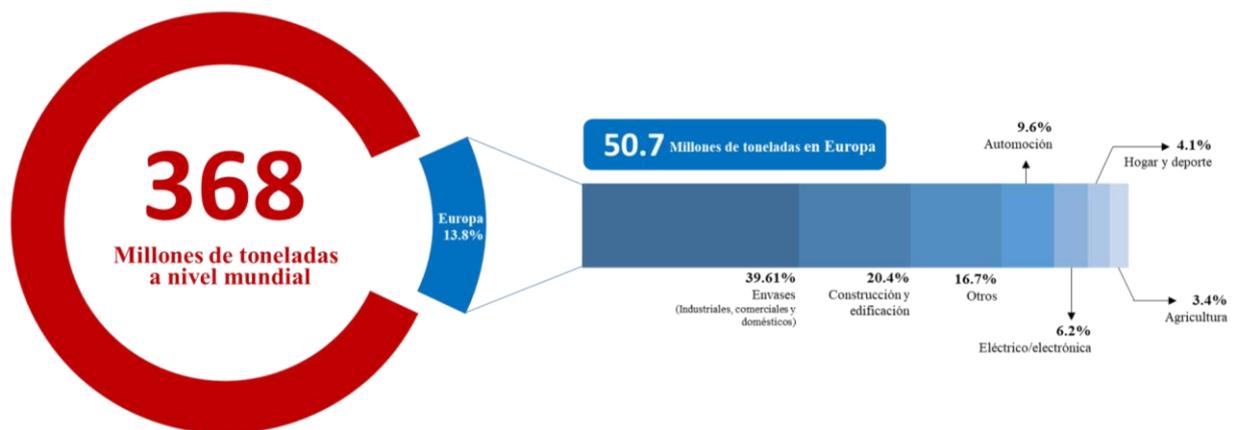


Figura 7. Producción de materiales plásticos en el mundo y demanda por sector en Europa, 2019 (Adaptación de PlasticsEurope, 2020).

Las estadísticas que se representan en la figura anterior nos dan una idea de los mercados más importantes en la aplicación de materiales plásticos, donde el sector principal es el de envasado y embalaje; después el de construcción, automoción, el sector eléctrico/electrónico y en menor porcentaje la industria del deporte, la agricultura, la industria pesquera y ganadera, el sector médico y cosmético, entre otros (Libera, 2019; PlasticsEurope, 2020).

Dado que el uso de plásticos está presente en todos los sectores económicos, la demanda de plásticos aumenta con el crecimiento de la economía mundial. En particular, el Consejo Mexicano de la Industria de Productos de Consumo A.C (CONMEXICO) reporta que la

industria del plástico generó el 2.8% del Producto Interno Bruto manufacturero en México en el 2020, donde las bolsas, autopartes y botellas de plástico son la principal producción (CONMEXICO, 2020; Fundación Heinrich Böll, 2020).

En el 2021 el consumo aparente de plásticos en México fue de 5.9 millones de toneladas, de las cuales aproximadamente el 44.7% son empleadas en el sector de envasado y empaques (CONMEXICO, 2021). Estos plásticos sirven para contener, preservar y proteger un producto, y una vez que cumplen su función son simplemente desechados. De esta manera, la pésima gestión de residuos y el sistema capitalista permiten que se desechen plásticos en perfecto estado únicamente por ser falsamente clasificados como *artículos de un solo uso o desechables* (Rivera Garibay et al., 2020). El ritmo de la vida moderna ha incrementado el empleo de plásticos de un solo uso a nivel global y en consecuencia aquellas ciudades con mayor densidad poblacional son las más contaminadas, entre ellas la Ciudad de México (González Cifuentes & Reyes Carrillo, 2010).

Usualmente, los envases y empaques tienen una vida útil muy corta, sin embargo, su permanencia en la naturaleza puede ser de hasta cientos de años, como se muestra en la tabla 2, ya que al contrario de lo que ocurre con las fibras naturales, el vidrio o incluso el metal, los plásticos no se descomponen para incorporarse a un ciclo que les permita regresar a la naturaleza (Cristán Frías et al., 2003).

Tabla 2. Tiempo aproximado de degradación para objetos plásticos desechables de uso cotidiano. (Adaptación de SEMARNAT, 2018)

Producto de plástico	Botellas	Cubiertos	Popotes	Vasos	Bolsas
Tiempo de degradación	500 años	400 años	100 años	65 años	55 años

Al ser el material más usado por todas las industrias, también es el material más desechado (Libera, 2019). Debido a que la producción de estos materiales no cesa, aunado a la mala disposición de los residuos por parte de sus usuarios, es cotidiano observar residuos plásticos abandonados en distintas zonas. Las estadísticas mencionadas nos muestran que una desmesurada cantidad de plástico está destinada a desecharse después de un solo uso, tal como las 5 billones de bolsas de plástico que se usan anualmente a nivel global o el millón de botellas desechables que se consumen cada minuto en todo el mundo (SEMARNAT, 2020). Si el consumo desmedido de plásticos continúa con el ritmo actual, el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) estima que para 2050 habrá 12 mil millones de toneladas de basura plástica contaminando el mundo (PNUMA, 2018).

Las opciones para la disposición de residuos sólidos, incluyendo los plásticos, son los rellenos sanitarios, la compactación, incineración y el reciclado (Cristán Frías et al., 2003). Como se ha mencionado, el reciclaje de materiales plásticos puede complicarse y su

incineración puede liberar compuestos volátiles tóxicos que atentan a la salud humana y al medio ambiente, tales como antimonio, furanos, dioxinas, bifenilos policlorados (PCB) y metales pesados (Libera, 2019; Gómez Serrato, 2016). La figura 8 nos da un panorama de la gran cantidad de plástico que puede encontrarse en un vertedero.



Figura 8. Recolectores de plástico en un vertedero, Mumbai. El fotógrafo revela que la mujer con tela roja vive en dicho lugar. Imagen por Randy Olson, recuperada desde National Geographic España, 2022.

Aunque se tengan lugares específicos para la recolección o la disposición final de los residuos plásticos, su ligereza y baja densidad contribuyen a su dispersión, de tal manera que la contaminación puede extenderse a todos los ecosistemas aun cuando los desechos se descarten adecuadamente. Por la misma razón, hasta el 40% de todos los desechos plásticos terrestres pueden terminar en los océanos, mares, ríos y lagos de agua dulce al verse dispersados por la lluvia o corrientes de viento; además, los medios acuáticos también exhiben contaminación por plásticos como resultado de actividades recreativas, embarques, sistemas de drenaje y por inundaciones (Crawford & Quinn, 2017).

Como muestra de este problema, se estima que anualmente alrededor de 13 millones de toneladas de residuos plásticos terminan en los océanos (Geyer et al, 2017). La mayoría de esta basura tiende a ser transportada largas distancias mediante corrientes convergentes marinas y por viento hasta congregarse en zonas específicas denominadas *parches*, los cuales fueron descubiertos en 1980 (Crawford & Quinn, 2017; Buteler, 2019). Una vez que los residuos plásticos se encuentran en estas zonas es poco probable que puedan abandonarlas, de tal manera que la concentración de basura en estos parches aumenta a medida que se desechan más plásticos (The Ocean Cleanup, 2022). Además, estos residuos terminan flotando en la superficie

dado que su densidad usualmente es menor a la del agua (Crawford & Quinn, 2017). Se conocen cinco parches de plástico en el mundo, los cuales se muestran en la figura 9, enumerados según su tamaño.

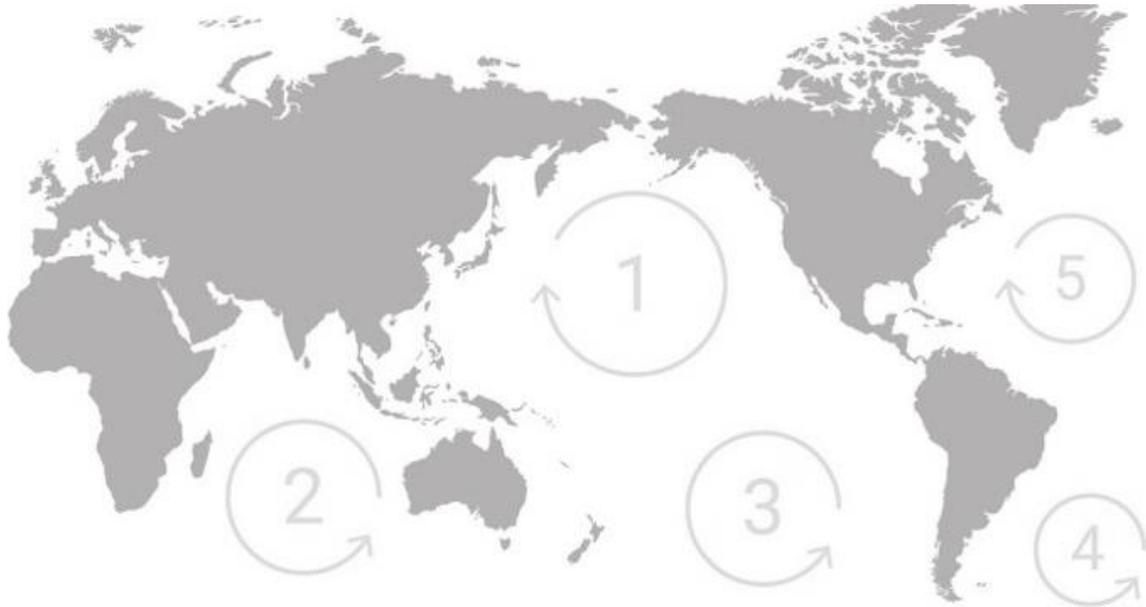


Figura 9. Parches de basura alrededor del mundo enumerados por su magnitud. Parche del Océano 1) Pacífico, 2) Índico, 3) Pacífico Sur, 4) Atlántico Sur y 5) Atlántico Norte. La masa concentrada en estos parches es mayor en el centro y decrece gradualmente en los límites exteriores, lo cual elimina el concepto de isla de basura al no ser una masa sólida Imagen recuperada desde The Ocean Cleanup, 2022.

La contaminación por plásticos repercute en los pilares sociales, económicos y políticos, así como la salud y la seguridad humana (SEMARNAT, 2018; Rivera Garibay et al., 2020). Además, el impacto ambiental que supone este tipo de contaminación amenaza para la flora y fauna a nivel global, ya que todos los ecosistemas se ven afectados y modificados por las grandes cantidades de plástico que resisten su degradación y descomposición. Se tiene evidencia de que diversos organismos, tanto terrestres como marinos, conviven con esta basura. En el 2015, un estudio reveló que alrededor de 690 especies se ven afectadas por el plástico que se encuentra en la naturaleza y, como si fuera poco, el 17% de estas están incluidas en la Lista Roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) según el informe Libera (2019); hasta el año 2021, esta cifra aumentó a 1,500 especies afectadas (Chamorro, 2021).

Las evidencias indican que la ingesta y el enredo son las principales interacciones que tiene la fauna con los plásticos desechados (Buteler, 2019). Por una parte, la ingesta puede provocar envenenamiento, desgarros y bloqueos en el aparato digestivo, así como sensación de saciado que conduce a la desnutrición del animal y subsecuentemente a la muerte (Buteler, 2019; Libera, 2019). El enredo puede causar malformaciones, limitación del movimiento del animal, mutilaciones y asfixia (Müller et al., 2012; Rivera Garibay et al., 2020). La figura 10 muestra algunas fotografías que denotan el impacto de los desechos plásticos en la fauna silvestre.

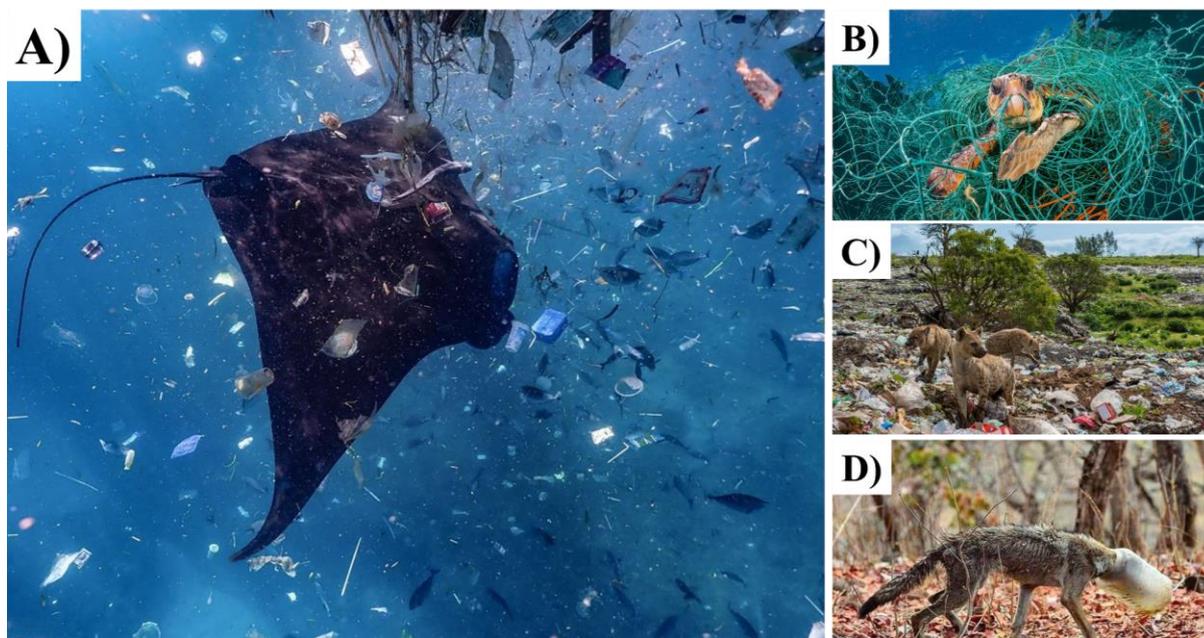


Figura 10. Ejemplo del impacto de los desechos plásticos en la fauna marina (A-B) y terrestre (C-D). **A)** Mantarraya intentando filtrar su alimento del plástico que flota a su alrededor. Imagen por Lori Pyke. **B)** Tortuga atrapada en una red. Imagen por Jordi Chias. **C)** Hienas en busca de alimento en un vertedero, Etiopía. Imagen por Brian Lehmann. Recuperadas desde National Geographic España, 2022. **D)** Lobo con recipiente de plástico en la cabeza, Nagpur. Imagen por Tanay Panpalia. Recuperada desde ABC Natural, 2018.

La invasión de los materiales plásticos en los diversos ecosistemas también provoca el desplazamiento de aves, variación en la fauna y aceleración en la pérdida de especies; otras consecuencias son la proliferación de insectos y colonización de bacterias y microorganismos en su superficie, lo cual los convierte en criaderos de plagas y vectores de enfermedades y patógenos (Gómez Serrato, 2016; Rivera Garibay et al., 2020). Más aún, mediante la colonización por microorganismos y por la exposición continua al ambiente, los plásticos son susceptibles a la degradación y erosión, lo cual les permite fragmentarse y esparcirse (Buteler, 2019; Rivera Garibay et al., 2020).

Posada Bustamante (1994) describe la degradación como cualquier cambio en las propiedades del material que son producto de las interacciones que este tiene después de que ha sido empleado; estos cambios son producidos principalmente en los plásticos por reacciones que rompen los enlaces poliméricos. La tabla 3 muestra los diferentes tipos de degradación a los que se ven expuestos los plásticos que se encuentran en la intemperie.

Tabla 3. Tipos de degradación a los que se ven expuestos los plásticos (Posada Bustamante, 1994; Gutiérrez Pescador, 2013; Cristán Frías et al., 2003).

Tipo de degradación	Descripción
Mecánica	Producida por esfuerzos cortantes, fricción, desgaste abrasivo, entre otros.
Química	Implica la acción de especies químicas, tales como ácidos, bases o solventes, los cuales desatan conversiones químicas de los compuestos de los que está formado el material
Térmica	Involucra cambios en la estructura interna del material por la exposición a altas temperaturas.
Fotodegradación	Producida por la radiación con luz ultravioleta o visible. Se generan iones o radicales libres como reactivos intermedios en la matriz polimérica, lo cual produce una reducción en su peso molecular y alteraciones tanto físicas como químicas.
Degradación biológica o biodegradación.	Implica la transformación bioquímica del material y se le atribuye a los materiales que se descomponen por medio de la participación de grupos microbianos o por microorganismos.

1.3 Generación y presencia de micro y nanoplásticos

Si bien los plásticos son altamente resistentes a la degradación, la exposición continua a los diversos factores bióticos y abióticos del ambiente resulta en la formación de fragmentos o partículas que pueden alcanzar la escala nanométrica (Magrì et al., 2018). De esta manera, se pueden obtener *microplásticos*, los cuales son aquellos fragmentos cuya dimensión más larga es menor a 5 mm y cuando alcanzan dimensiones menores a 1 μm , son denominados como *nanoplásticos* (Crawford & Quinn, 2017).

Los micro y nanoplásticos pueden ser primarios o secundarios dependiendo de su origen (Wang et al., 2018). Los primarios se manufacturan de manera intencional por parte de la industria para incluirlos en sus productos, tales como microperlas usadas en cosméticos, exfoliantes, pasta de dientes, productos de limpieza y de cuidado personal, entre otros. Por su parte, los secundarios no son creados de manera intencional, sino que terminan siendo producto de la degradación de piezas de plástico más grandes (Crawford & Quinn, 2017; SEMARNAT, 2018); además, dependiendo de su forma, pueden ser divididos en fragmentos, fibras, espumas y pellets (Wang et al., 2018). Algunos ejemplos de microplásticos primarios y secundarios se ilustran en la siguiente figura.



Figura 11. Microplásticos primarios (izquierda) y secundarios (derecha). Imágenes recuperadas desde Aliexpress y National Geographic España, 2022.

Al alcanzar dicho tamaño, resulta difícil retirarlos del ambiente y estos persisten a medida que se hacen cada vez más pequeños (Buteler, 2019). Además, los micro y nanoplásticos que se encuentran en el ambiente exhiben distintas propiedades físicas y químicas debido que su origen es variado, al igual que el tipo de degradación que han experimentado (Wang et al., 2018). Si bien la presencia de estos fragmentos tiene relación con la densidad de población, la dispersión de estas partículas provoca la contaminación de cuerpos de agua salada y dulce (Crawford & Quinn, 2017; Rivera Garibay et al., 2020; Prata et al., 2021), de la matriz del suelo (Wahl et al., 2021; Zhu et al., 2019; Lozano et al., 2021) e incluso de la atmósfera (Jenner et al., 2021; Jenner et al., 2022; Prata, 2018). Su ubicuidad es tal que estas partículas se encuentran en lugares en los que la civilización o el ser humano no se ha establecido, tales como en la Antártida (Waller et al., 2017), el monte Everest (Wilkinson, 2020) y en las profundidades del océano (Woodall et al., 2014).

Los micro y nanoplásticos pueden ser de diferente color, forma y tamaño (Crawford & Quinn, 2017). Además, poseen una elevada relación superficie/volumen y pueden mostrar efectos cuánticos al llegar a la nanoescala, lo cual puede modificar sus propiedades físicas y químicas, tales como su reactividad, carga superficial, resistencia eléctrica o la capacidad de absorción de contaminantes químicos, por mencionar algunos (Crawford & Quinn, 2017; Schirinzi et al., 2017; Wang et al., 2018). El impacto que tienen los microplásticos es difícil de evaluar, sin embargo, vastas investigaciones confirman mortalidad, directa o indirecta, de los organismos principalmente por la ingestión de estos fragmentos plásticos. Los animales confunden estos pedazos de plástico con alimento, lo cual puede causar desnutrición, alteración del metabolismo, alteración endocrina, daño hepático, disminución en la fecundidad, respuesta inflamatoria, malformaciones y muerte celular (Huang et al., 2022; Magrì et al., 2018).

A pesar de su tamaño, los microplásticos aún siguen siendo macromoléculas, de tal manera que, una vez dentro del cuerpo, persisten por la ausencia o baja actividad de enzimas

catabólicas que puedan romper los enlaces C-C (Perdomo, 2002; Suasnavas Flores, 2017; Yoshida et al., 2016). Además, se ha demostrado que los microplásticos pueden actuar como portadores de metales pesados y contaminantes orgánicos (Wang et al., 2018). De esta manera, la ingestión de microplásticos pueden causar exposición a sustancias peligrosas, desencadenar inmunorreacciones locales, así como provocar bioacumulación y biomagnificación de químicos (Schwabl et al., 2019; Rivera Garibay et al., 2020).

Como ejemplo de esta problemática, la figura 12 muestra los fragmentos de plástico que se encontraron en el estómago de un polluelo albatros después de matarlo. Es importante señalar que los microplásticos que ingiere un organismo pueden ser transferidos a otro por medio de la ingesta de presas, por lo que la presencia de los microplásticos se ve extendida por la cadena trófica, y por ende, puede llegar al humano (Pérez Guevara et al., 2021). Además, los nanoplásticos son incluso más pequeños que las células eucariotas, por lo que es probable su translocación entre órganos e influencia a nivel celular y molecular (Prata, 2018; Hollóczki & Gehrke, 2020).



Figura 12. Fragmentos de plástico, ordenados de mayor a menor tamaño, que se encontraron en el estómago de un polluelo albatros después de matarlo. Imagen por Mandy Barker. Recuperada desde National Geographic España, 2022.

1.4 Interacción humana con nanopartículas

Los avances de la nanotecnología han motivado el uso de nanopartículas en el sector electrónico, alimentario, textil, de envasado, en productos para el hogar y cuidado personal e incluso en la medicina (Schirinzi et al., 2017). Si bien la comercialización de estos productos aumenta la exposición humana a nanopartículas, los humanos han estado siempre expuestos a partículas dentro del rango nanométrico a partir de fuentes naturales como es el caso de la ceniza de incendios forestales o de erupciones volcánicas (Wick et al., 2010). Sin embargo, la emisión de partículas de este tamaño por fuentes antropogénicas aumentó después de la Revolución Industrial, sobre todo de materiales como el PVC y fibras textiles (Wick et al., 2010; Zarus et al., 2020).

De esta manera, las nanopartículas se encuentran en contacto directo y continuo con el humano, independientemente si son naturales o sintéticas (Rubio et al., 2020). Las principales rutas de exposición para los humanos son la inhalación, ingestión y absorción dérmica, donde la boca, el cabello, y la piel del rostro y las manos podrían ser los principales receptores pasivos (Zarus et al., 2020; Abbasi & Turner, 2020). Por ello, la evaluación de nanopartículas es indispensable para determinar los posibles efectos en la salud. Más aún, la evaluación de partículas de materiales poliméricos, tales como los plásticos, es primordial debido a las propiedades ya mencionadas que estos poseen.

Capítulo II: Antecedentes

La problemática de microplásticos es tal que Eriksen y colaboradores estimaron en 2014 que los microplásticos representan alrededor del 92% de la contaminación acuática y un estudio de Greenpeace México, en 2020, confirmó la presencia de microplásticos en 42 playas mexicanas y en 21 áreas arrecifales situados en Áreas Nacionales Protegidas (Rivera Garibay et al., 2020). Diversos estudios confirman la presencia de microplásticos en animales marinos, desde cetáceos, peces y cangrejos (Burkhardt-Holm & N'Guyen, 2019; Parker et al., 2020, Zarus et al., 2020) hasta medusas (Rapp et al., 2021), incluyendo especies de consumo humano. Además, se ha evidenciado la contaminación por microplásticos en diferentes alimentos, tales como la sal (Iñiguez et al., 2017; Danopoulos et al., 2020), el azúcar (Afrin et al., 2022), sardinas enlatadas (Karami et al., 2018), carne de pollo (Kedzierski et al., 2020) cerveza (Liebezeit & Liebezeit, 2014), miel (Al Naggar et al., 2021; Wright & Kelly, 2017) y agua embotellada (Kosuth et al., 2018).

Los estudios que aseguran la exposición humana directa e indirecta a microplásticos van en aumento, así como las publicaciones relacionadas a los efectos al organismo humano, tal como reporta Bhuyan (2022). Dependiendo del consumo de los alimentos contaminados con estas partículas, se podría estar ingiriendo de 0.1 a 5 g de plástico a la semana (Senathirajah et al., 2021) o de 39,000 a 52,000 microplásticos anualmente, dependiendo de la edad, dieta y sexo, donde el consumo constante de agua embotellada hace que la cantidad aumente hasta a 193,200 microplásticos según investigaciones más recientes (Cox et al., 2019; Senathirajah et

al., 2021). La ingesta de plástico está corroborada de igual manera mediante estudios que confirman la presencia de estas partículas en heces humanas (Luqman et al., 2021; Schwabl et al., 2019; Pérez Guevara et al., 2021).

Más, aún, no solo la ingesta es alarmante, sino que los trabajos de Jenner y colaboradores demuestran la exposición a altas concentraciones de microplásticos en el aire, dentro de hogares y en áreas de alta actividad humana e industrial, con una incidencia de $1,414 \pm 1,022$ y $3,055 \pm 5,072$ microplásticos por metro cuadrado al día, respectivamente (Jenner et al., 2021; Jenner et al., 2022); estas cifras se ven influenciadas por factores meteorológicos y geográficos, tales como la velocidad y dirección del viento, la topografía urbana y la ventilación en lugares cerrados (Prata, 2018).

Los problemas de salud que pueden desarrollarse a partir de la interacción de los microplásticos con el organismo pueden deberse a las propiedades intrínsecas de estos o a la liberación de químicos absorbidos en su superficie, tales como sustancias contaminantes o aditivos de su manufactura (Pantoja Muñoz et al., 2022). Como precedente, el ejemplo con mayor relevancia es la toxicidad del PVC y de su monómero cloruro de vinilo, ya que trabajadores industriales expuestos a altas concentraciones de estos microplásticos en su ambiente de trabajo han mostrado diversos problemas respiratorios (Prata, 2018). En comparación, pocos estudios han explorado los efectos de los demás plásticos en el cuerpo humano, sobre todo debido a restricciones éticas y a altos costos de experimentación; no obstante, algunas investigaciones se basan en modelos *in vitro*, haciendo uso de líneas celulares o modelos que imiten las condiciones fisiológicas de interés (Tamargo et al., 2022).

Los efectos expuestos incluyen inflamación, toxicidad respiratoria, inmunotoxicidad, genotoxicidad y daño en las funciones de diversos órganos tales como los pulmones, el hígado y los riñones; además, se han reportado efectos citotóxicos como estrés oxidativo, apoptosis, alteración del metabolismo, daño al ADN, entre otros, con una posible relación al desarrollo de cáncer (Bhuyan, 2022; Yuan et al., 2022; Wright & Kelly, 2017; Prata, 2018; Zarus et al., 2020). La figura 13 resume las vías de exposición, órganos en los que se ha encontrado bioacumulación de microplásticos y los posibles efectos adversos.

Vías de exposición

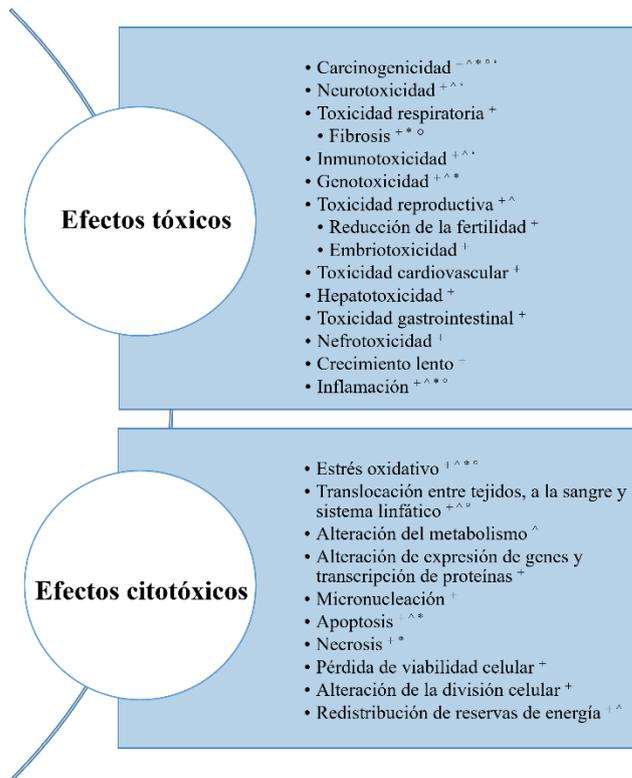
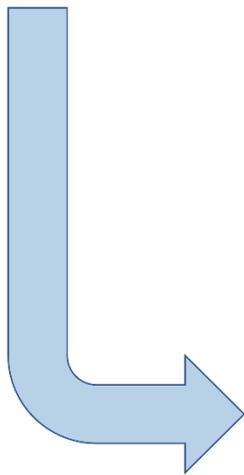
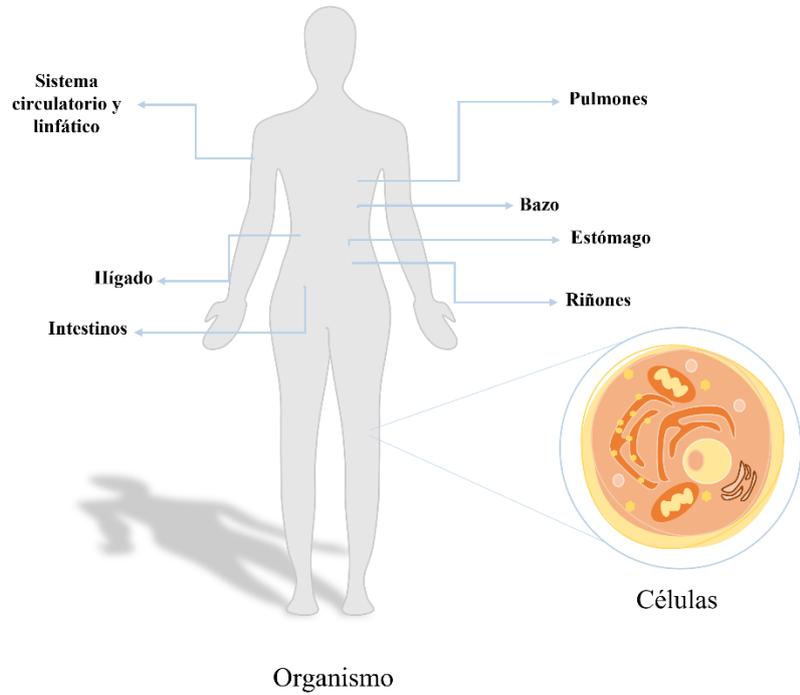
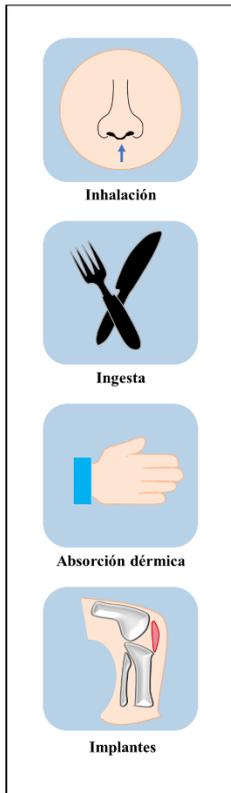


Figura 13. Vías de exposición humana a microplásticos; órganos y tejidos donde se ha demostrado bioacumulación y efectos relacionados que se han explorado en la literatura. (Elaboración propia. Información de Yuan et al., 2022 ⁺; Zarus et al., 2020 ⁺; Bhuyan, 2022 [^]; Wright & Kelly, 2017 ^{*}; Prata, 2018 ^o).

2.1 Cuestión de género: mujeres sobreexpuestas a microplásticos

Las investigaciones de Jenner y colaboradores (2022) exhiben la presencia de 1.42 a 1.5 microplásticos por gramo de tejido pulmonar e investigaciones de Leslie y colaboradores (2022) identificaron por primera vez microplásticos en la sangre, con una incidencia de 1.6 μg de microplásticos por mL de sangre. Además, Ragusa y colaboradores (2021 y 2022) identificaron hasta 12 microplásticos en la placenta humana, los cuales se encontraron en el lado fetal y materno. Éste último hallazgo reitera la conclusión de Wick y colaboradores (2010), quienes demostraron que los materiales a nanoescala ($>240\text{ nm}$) pueden atravesar la barrera placentaria.

De hecho, el género femenino tiene mayor riesgo de exposición a microplásticos en comparación al género masculino, como se ejemplifica en la figura 14. Los principales motivos son el uso frecuente de cosméticos o productos de higiene personal con plástico en su composición y a los roles que se les asigna por ser mujeres, tales como tareas domésticas que implican el uso de productos de limpieza con microplásticos en su composición (Fundación Heinrich Böll, 2019). El uso de geles de baño, por ejemplo, puede contribuir en la emisión de 39 toneladas anuales de microplásticos al ambiente (Lei et al., 2017). Abbasi y colaboradores (2020) encontraron hasta 50 microplásticos en una muestra de agua con la que una mujer de Irán se enjugó el rostro. Al recopilar datos sobre su estilo de vida, la mujer indicó hacer uso de exfoliantes en el rostro de manera continua (Abbasi & Turner, 2020). Las investigaciones de Pantoja Munoz y colaboradores (2022), así como las de Ó Briain y colaboradores (2021), evidencian la fragmentación de productos para el periodo menstrual, tales como tampones, toallas sanitarias y toallas húmedas; además, mediante análisis de composición química se denota la presencia de plástico, tales como PE, PP y PET en este tipo de productos (Pantoja Munoz et al., 2022; Ó Briain et al., 2021). De esta manera, las mujeres podrían estar expuestas hasta a 17 mil millones de nanoplasticos por cada tampón que usen y hasta 86 trillones de microplásticos al usar tampones durante todos sus ciclos menstruales (Pantoja Munoz et al., 2022).

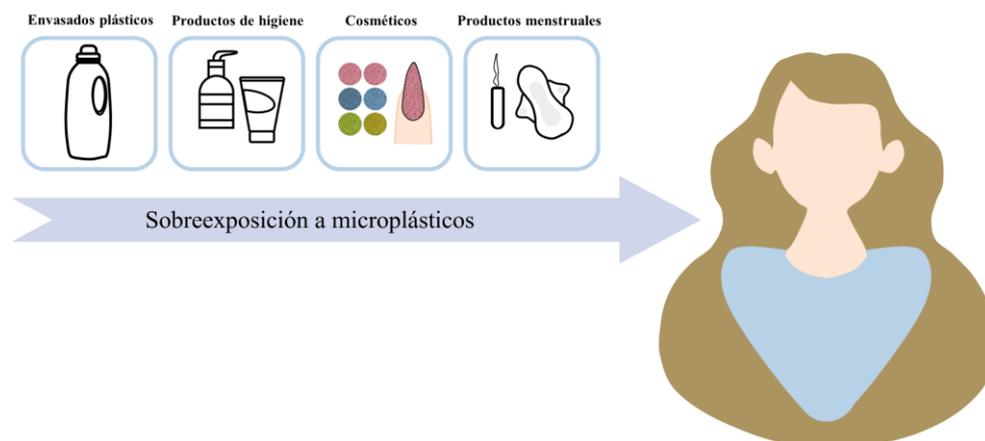


Figura 14. Ilustración que ejemplifica la sobreexposición del género femenino a microplásticos, sobre todo de microplásticos primarios en diversos productos de higiene y cosméticos, entre otros.

Como se ha mencionado anteriormente, las toxinas, como aditivos o contaminantes químicos, que estén en la superficie de los plásticos afectan a la salud humana. En particular, el género femenino muestra mayor sensibilidad a estos compuestos químicos en fases como la pubertad, el embarazo y la lactancia; además, en zonas con alto contenido graso, como lo son las mamas, los químicos solubles en aceite (como los ftalatos) se acumulan con mayor facilidad (Fundación Heinrich Böll, 2019). Se tiene evidencia que algunos químicos pueden causar cáncer de mama, infertilidad o pubertad prematura, actuar como disruptores endocrinos o atravesar la placenta y alterar el desarrollo de los fetos (Fundación Heinrich Böll, 2019). Por ejemplo, Colón y colaboradores (2000) relacionan la incidencia de telarquía (crecimiento prematuro del tejido mamario) con la presencia de ésteres de ftalatos tras el análisis de suero de niñas con dicha condición en Puerto Rico. Más aún, Serpooshan y colaboradores (2018) demostraron la importancia del sexo de las células en la absorción de nanopartículas, ya que se presentan diferencias en los factores de captación tales como en los factores paracrinos y del citoesqueleto, incluyendo cambios en la mitocondria y en retículo endoplásmico.

Para analizar esta problemática se han empleado modelos celulares o con animales para averiguar los posibles efectos de los microplásticos en la salud. En la tabla 4 se resumen algunas investigaciones con enfoque en la transferencia de microplásticos desde la madre hacia su descendencia en modelos de ratón, así como la translocación de estas partículas entre órganos y tejidos.

Tabla 4. Resumen de investigaciones que denotan los efectos adversos de microplásticos y nanopartículas en ratones hembra preñadas y en etapa de lactancia.

Autor	Elemento de estudio	Metodología	Hallazgo
(Hu et al., 2021)	Afectación de la placenta de ratones hembra preñadas por la exposición a microplásticos.	Ratones hembra preñadas fueron expuestas a partículas de PS comerciales de 10µm en la etapa temprana del embarazo por vía intraperitoneal. Se evaluó la viabilidad de células inmunes mediante citometría de flujo y se realizaron análisis histológicos de la placenta.	Se observó disminución en el diámetro de las arteriolas uterinas de los ratones hembra, al igual que la reducción de células natural killer (NK) y cambio en la secreción de citocinas.
(Huang et al., 2022)	Afectación transgeneracional a crías de ratones hembra expuestas a microplásticos	Ratones hembra preñadas fueron expuestas durante la gestación y lactancia a nanopartículas de PS comerciales (100 nm) en dosis de 0.1, 1 y 10 mg/L. Los órganos de las crías macho se analizaron para determinar el peso, la cantidad de estrés oxidativo, la morfología de cortes histopatológicos, la	Los ratones descendientes de ratones hembra tratadas con nanopartículas de PS presentaron hepatotoxicidad, respuesta inflamatoria, estrés oxidativo, así como interrupción de espermatogénesis, aunado a deterioro en el

		concentración de citocinas inflamatorias, recuento de espermatozoides y extracción de ARN.	desarrollo y lesiones oxidativas testiculares.
(Melnik et al., 2013)	Afectación transgeneracional a crías de ratones hembra expuestas a nanopartículas de plata	Se realizó un experimento <i>in vivo</i> , con ratones hembra en periodo de lactancia, a las cuales se les administraron nanopartículas de plata comerciales de tamaño de 8.4 nm a 80.9 nm por vía intragástrica. El cerebro, el hígado y el útero con los fetos fueron colectados para posteriores análisis, así como muestras de leche materna.	Se encontraron nanopartículas de plata en el cerebro e hígado de ratones hembra expuestas, al igual que en los fetos. Las nanopartículas penetran en la placenta y llegan a la leche materna; en particular, se detectaron dosis máximas en los riñones de los fetos.
(Morishita et al., 2016)	Distribución de nanopartículas a leche materna en ratones hembra en periodo de lactancia.	Nanopartículas de plata de 100, 50 y 10 nm se administraron vía intravenosa a ratones hembra en diferentes periodos de lactancia. Después de al menos 12 h de administración se realizaron análisis hematológicos, análisis bioquímicos de sangre, ensayos de apoptosis de glándulas mamarias y análisis de la composición de leche.	Se demuestra que nanopartículas de plata de 10 nm tienen mayor facilidad para distribuirse a la leche materna de ratones hembra lactantes sin producir daño aparente a las glándulas mamarias, sobre todo cuando se les expone en la etapa temprana de lactancia.
(Mortensen et al., 2019)	Recopilación sobre los efectos de nanomateriales en la placenta.	Recopilación y resumen de información encontrada en la literatura relacionada con la deposición de nanomateriales en la placenta, así como las interacciones biológicas, el desarrollo y las afectaciones en su función.	Entre los efectos que se mencionan se incluye aumento de estrés oxidativo, inducción de respuestas biológicas tales como respuestas inflamatorias, daño al ADN, interferencia con estructuras celulares, perturbación en la expresión de genes, posible apoptosis o necrosis celular y/o afectaciones cardiovasculares y neuroconductual.

Las discrepancias entre las técnicas de identificación y cuantificación, así como en metodologías y modelos de estudio, provocan que la comparabilidad de datos y conclusiones no sea el adecuado (Pérez Guevara et al., 2021). Sin embargo, la comunidad científica dirige

esfuerzos para eliminar estos sesgos de información y poder tener información sobre los riesgos que la interacción con microplásticos podría significar para la salud del ser humano.

2.2 Línea celular MDA-MB-231

La línea celular MDA-MB-231 fue obtenida de una paciente femenina de 51 años; son células de adenocarcinoma de mama, grado III, con morfología tipo epitelial y adherente que pueden cambiar su aspecto morfológico hacia uno de aspecto neuronal (Rodríguez Bandala, 2010). Entre las características del cáncer se encuentra la transcripción y traducción inapropiada de genes, de tal manera que el crecimiento de la célula no ocurre de manera normal; la división celular se estimula y se inhibe la muerte celular, por lo que las células proliferan a una tasa acelerada (Rodríguez Bandala, 2010). De esta manera, estas células son útiles en el campo de la investigación, gracias a la facilidad que tienen para crecer en cultivos celulares. En este trabajo, células MDA-MB-231, acopladas a proteína GFP, se utilizaron como modelo celular para averiguar las interacciones y reacciones que las células tienen al estar en contacto con diferentes dosis de microplásticos.

Justificación:

Debido a su tamaño y composición, los micro y nanoplásticos exhiben propiedades que pueden resultar perjudiciales para el bienestar de la flora y fauna, incluido el humano. Además, las mujeres tienen mayor exposición a las partículas plásticas por los roles asignados al género femenino, así como el uso frecuente de productos de higiene y cosméticos que las contienen. Estudios recientes revelan la presencia de estas partículas en la sangre, pulmones y placenta humana, por mencionar algunos. Más aún, se indica que los micro y nanoplásticos pueden entrar por diferentes vías al cuerpo humano y translocar hacia diferentes órganos. Este trabajo investiga los efectos citotóxicos y la internalización de nanopartículas de tereftalato de polietileno (PET) en la línea celular MDA-MB-231, ya que este es uno de los plásticos más usados y descartados en la actualidad. La importancia de este trabajo radica en brindar información a partir de un modelo *in vitro* que sirva para comprender el daño potencial de estas partículas en la salud humana, con un enfoque al género femenino.

Hipótesis:

Las nanopartículas de tereftalato de polietileno (PET) serán internalizadas por las células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 y alterarán su viabilidad, características y función al provocar efectos citotóxicos.

Objetivos:

Objetivo general:

Evaluar los efectos citotóxicos de las partículas de polietileno tereftalato (PET) en células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 y determinar su capacidad de internalización para ofrecer una perspectiva sobre los posibles daños a la salud humana.

Objetivos específicos:

- Analizar las propiedades físicas y la estabilidad de las nanopartículas de PET en las diferentes soluciones utilizadas en el cultivo celular.
- Identificar la concentración de nanopartículas de PET que muestra efectos nocivos significativos al interactuar con las células MDA-MB-231 mediante ensayos de viabilidad celular.
- Estudiar el tiempo de internalización de las nanopartículas de PET por las células y observar los mecanismos de internalización por microscopía fluorescente.
- Evaluar la liberación de nitritos de las células MDA-MB-231 que interactúan con las nanopartículas de PET para denotar los efectos en la proliferación celular.
- Estimar la cantidad de biomasa en las células con nanopartículas de PET por medio de la cuantificación de proteínas para estudiar su relación con la viabilidad celular.
- Demostrar la internalización de las nanopartículas de PET en las células MDA-MB-231 e identificar su localización mediante microscopía confocal.

Capítulo III: Metodología

3.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas de PET

Las partículas de PET empleadas en este trabajo fueron sintetizadas siguiendo el protocolo descrito por Rodríguez Hernández y colaboradores (2019), el cual permite la síntesis de nanopartículas de PET sin alteración química. Para ello, el fondo de una botella se cortó con una sierra para obtener desechos finos, los cuales se separaron por tamaño empleando un tamiz No. 70 (220 μm de tamaño de apertura). De esta manera se recuperó 1 g de partículas con tamaño menor a 0.2 mm; posteriormente, se disolvieron en 10 mL de ácido trifluoroacético concentrado (90% v/v) a 50°C por 2 h con agitación constante. La solución se dejó reposar por una noche y después se agregó 10 mL de una solución diluida de ácido trifluoroacético (20% v/v) bajo agitación vigorosa por 2 h para precipitar los micro y nanoplasticos. La solución se mantuvo en reposo durante la noche y posteriormente se centrifugó a 2,500 g durante 1 h; el sobrenadante fue desechado y el pellet se resuspendió en 100 mL de 0.5 % dodecilsulfato sódico, seguido por agitación vigorosa y ultrasonificado. La solución se dejó en reposo durante 1 h para que las nanopartículas se asentaran y finalmente se recuperaron los micro y nanoplasticos presentes en los 50 mL de la parte superior de la suspensión y se dejaron secar.

3.1.1 Dispersión dinámica de luz (DLS)

Para determinar las propiedades físicas de las partículas sintetizadas se empleó la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés). Esta técnica permite la medición de manera simple y reproducible del tamaño de partículas en soluciones coloidales, así como la medición de la carga superficial a partir de la estimación del potencial Z (Bhattacharjee, 2016). El fundamento para determinar la distribución de tamaños es el movimiento browniano de las partículas en la dispersión coloidal, el cual es aleatorio y traslacional; a partir de la incidencia de un rayo láser, las partículas dispersan la luz incidente dependiendo de su tamaño y de dicho movimiento, lo cual provoca que se observen interferencias constructivas o destructivas en la intensidad de la luz dispersada respecto al tiempo en un detector (Malvern Panalytical, 2022; Cuadros-Moreno et al., 2014). A partir de este comportamiento, es posible determinar el radio hidrodinámico R_H de las partículas mediante la ecuación Stokes-Einstein, la cual se muestra en la ecuación 1, donde D_t es el coeficiente de difusión traslacional (cambios en la fluctuación de intensidad), k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura y η la viscosidad absoluta de la solución coloidal (Bhattacharjee, 2016).

$$D_t = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad \text{Ec.1}$$

Las representaciones sobre el fundamento de esta técnica, así como de las definiciones del radio hidrodinámico y la corona se encuentran ilustradas en la siguiente figura.

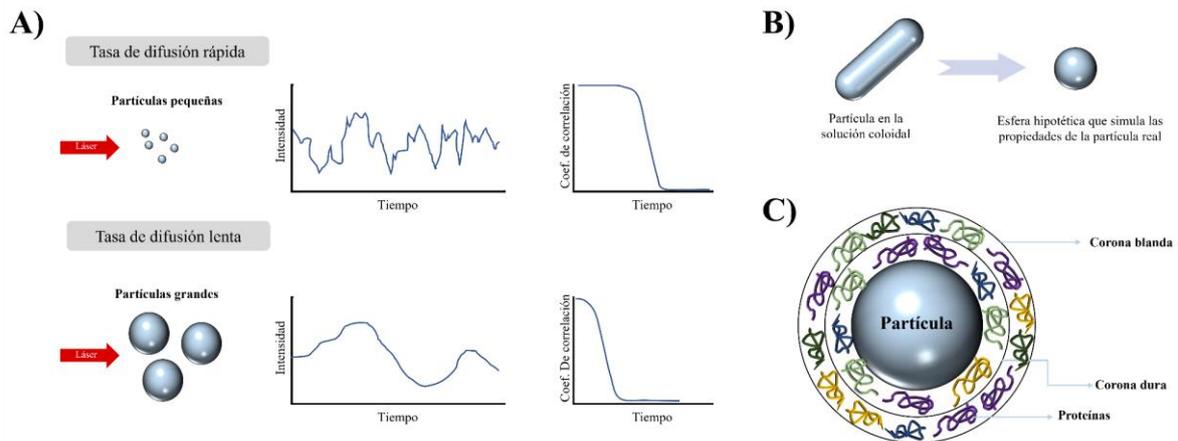


Figura 15. A) Ilustración que ejemplifica los cambios en la intensidad de dispersión por las condiciones de interferencia de partículas pequeñas y grandes, las cuales muestran una tasa de difusión o variación de la intensidad de dispersión rápida y lenta correspondientemente. B) Concepto de radio hidrodinámico. C) Esquema sobre la formación de coronas en las partículas.

El R_H se define como el radio de una esfera dura hipotética que se mueve a la misma velocidad y que tiene el mismo coeficiente de difusión traslacional D_t de las partículas en la solución, como se ejemplifica en la figura 15B. Las esferas duras rara vez existen en dispersiones coloidales, ya que las partículas se ven alteradas dependiendo de la adsorción de moléculas, iones o proteínas en su superficie; este fenómeno es denominado como formación de coronas (Bhattacharjee, 2016). Su formación tiene naturaleza dinámica, donde la fuerza iónica, las constantes de equilibrio y la naturaleza del solvente determinarán el tipo de asociación y disociación que tenga con la partícula, pudiendo haber coronas duras y blandas, como se ejemplifica en la figura 15C. La corona dura es aquella formada por proteínas que se encuentran unidas de manera estable debido a la alta afinidad que tienen por la superficie de la partícula; por otra parte, la corona blanda es formada por proteínas con baja afinidad que pueden ser reemplazadas rápidamente (Diaz Acosta, 2018; Ge et al., 2015).

Además, con los equipos modernos de DLS también se puede medir el potencial Z , el cual mide la magnitud de la repulsión/atracción electrostática entre las partículas que se encuentran en la solución (Malvern Panalytical, 2022). Durante electroforesis, las partículas dispersan la luz del láser incidente; el cambio de frecuencia del láser incidente es proporcional a la velocidad de las partículas y con ayuda de las ecuaciones mostradas en Ec.2 se obtiene la estimación del potencial Z , donde μ_e es la movilidad electroforética, V es la velocidad de la partícula ($\mu\text{m/s}$), E es la fuerza del campo eléctrico (Volt/cm), ϵ_r la constante de permitividad relativa, ϵ_0 la permitividad del vacío, η la viscosidad a la temperatura experimental y ζ es el potencial Z (Bhattacharjee, 2016).

$$\mu_e = \frac{V}{E} = \frac{2\epsilon_r\epsilon_0\zeta}{3\eta} \quad \text{Ec.2}$$

Para determinar estas propiedades, se realizó una solución madre con 10 mg de las partículas de PET en 1 mL de etanol al 70%; dicha solución se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante una noche. Después, se realizó una solución con concentración de 1 mg/mL de partículas de PET mezclando 100 μ L de la solución madre con 900 μ L de agua destilada. Se sonicó por 1 minuto y se realizaron las medidas de diámetro hidrodinámico, para estimar la distribución de tamaño, y del potencial Z utilizando celdas capilares dobles en el equipo Zetasizer NanoZS (Malvern). Los parámetros utilizados fueron agua como dispersante y poliestireno (PS) como material, ya que la opción de PET no está disponible.

De igual manera se determinó el comportamiento de las partículas de PET en los distintos medios que se emplearon para el cultivo celular. Para ello, se realizó una tercera solución con una concentración de 100 μ g/mL de partículas de PET con agua destilada; se centrifugó a 1,500 rpm por 5 min, se quitó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de buffer fosfato salino (PBS 1X). Se etiquetaron 6 tubos eppendorf y se les agregó 1 mL de una de las siguientes sustancias: Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM; Sigma-Aldrich), PBS 1X, Gibco Minimum Essential Medium (MEM; Sigma-Aldrich), DMEM y MEM suplementados con 10% Suero Fetal Bovino (SFB; Biowest) y 1% antibiótico-antimicótico 100x (penicilina y estreptomycin; Sigma-Aldrich) y SFB al 50%. La distribución de tamaño y el potencial Z de cada sustancia se midió a manera de control, con el parámetro PBS como dispersante. Posteriormente se les agregó 10 μ L de la solución de PET en PBS 1X con concentración de 100 μ g/mL, se sonicó por 5 minutos y se realizaron nuevamente las medidas correspondientes, con los parámetros de PBS como dispersante y PS como material. Todas las muestras fueron sometidas a tres mediciones.

3.2 Evaluación de la toxicidad de las nanopartículas de PET

Para determinar la toxicidad de las nanopartículas de PET en la línea celular MDA-MB-231 (ATCC HTB26) se realizaron ensayos de viabilidad, medición de liberación de nitritos, cuantificación de proteínas totales y seguimientos mediante microscopía fluorescente y confocal. Las condiciones de incubación fueron atmósfera de 37°C con 5% CO₂ en una incubadora SHEL LAB (Sheldon Manufacturing). El mantenimiento y los subcultivos de la línea celular se realizaron con medio DMEM y MEM, suplementados con 3.7 g/L de bicarbonato de sodio (NaHCO₃; Sigma-Aldrich), 10% SFB y 1% antibiótico-antimicótico. Se realizaron suspensiones celulares utilizando tripsina con ácido etilendiaminotetraacético (tripsina/EDTA; Gibco™) para levantar la línea celular; para ello, las células se incubaron con 0.5 mL de esta sustancia durante 5 min con atmósfera de 37°C y 5% CO₂. Después, se agregó 1 mL de DMEM suplementado y se recuperó el medio con las células en un tubo eppendorf. Se centrifugó a 1,500 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante y las células recuperadas se resuspendieron en 1 mL de DMEM suplementado. El conteo celular se realizó con 10 μ L de esta última solución en un hemocitómetro (o cámara de Neubauer) bajo un microscopio óptico (Nikon; ECLIPSE TE300).

3.2.1 Ensayo de viabilidad y proliferación

La viabilidad celular se refiere al análisis de la proporción de células vivas y funcionales que hay en una población celular; la estimación de la viabilidad sirve como control para monitorear las condiciones óptimas (o no) en las que las células proliferan y mantienen sus funciones (Lopez Alvarez, 2019). El análisis de la viabilidad y proliferación de la línea celular MDA-MB-231 en presencia de las nanopartículas de PET se llevó a cabo mediante un ensayo colorimétrico, utilizando el reactivo AlamarBlue® (Sigma-Aldrich). Este reactivo contiene el compuesto resazurina (7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-1-ium-3-one), de color azul, que se reduce por las células viables a resorufina, un compuesto altamente fluorescente de color rosa; de esta manera, este reactivo es indicador de células metabólicamente activas y puede evaluarse de manera cualitativa y cuantitativa por medio de la observación de cambio de color y por la lectura de absorbancia o fluorescencia respectivamente (Rampersad, 2012).

Se evaluó la citotoxicidad de 6 concentraciones de partículas de PET: 1 mg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 100 ng/mL y 10 ng/mL, las cuales se obtuvieron mediante diluciones seriadas en DMEM. Dichas concentraciones se colocaron por triplicado al 10% (v/v) en una placa de 96 pocillos, incluyendo pozos sin tratamiento como control positivo (C+) y pozos con dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich) 10% (v/v) como control negativo (C-). En cada pozo se colocaron 10,000 células y se incubaron por 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 a 37°C con 5% CO₂ con un volumen final de 200 µL. Al finalizar los periodos de incubación, se agregó AlamarBlue® 10% (v/v) con respecto al medio de cultivo y se incubó durante 4 horas a las mismas condiciones para su posterior lectura. La lectura se realizó con 100 µL del medio de cultivo de cada pozo mediante fluorimetría, utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia (Agilent Technologies; modelo Cary Eclipse) con una longitud de onda de excitación de 560 nm y emisión de 590 nm.

Además, para observar los efectos de la interacción de las partículas de PET con las células, se tomó una micrografía cada 24 h a un pozo de cada concentración de partículas de PET, incluyendo ambos controles, de un ensayo de viabilidad de 72 h. Para ello, se empleó un microscopio fluorescente (Etaluma LS720) con aumento de 10x y el software Lumaview720, con el cual se recuperaron micrografías de campo claro.

3.2.2 Ensayo de liberación de nitritos

Los iones de nitrógeno, los nitritos y nitratos se encuentran en casi todos los organismos vivos; en los mamíferos, estas moléculas se encuentran de manera endógena o dietética, es decir, provienen del interior de las células o de una fuente externa (Sigma-Aldrich, 2021). En particular, el óxido nítrico (NO) es una molécula de tamaño pequeño que tiene un papel clave en la señalización intracelular; las diferentes señales bioquímicas en las que se ve envuelto, que van desde funciones de digestión hasta de respuesta inmune, son esenciales para la homeostasis (Cuéllar Mata et al., 2010).

El radical NO* tiene un electrón desapareado, lo cual le confiere alta reactividad con otros átomos, tales como nitrógeno, azufre o hierro. Estos átomos forman parte de las proteínas y hemoproteínas, de tal manera que la unión del NO* con estas moléculas (proceso denominado nitración) le confiere actividad fisiológica; entre sus funciones se encuentra la promoción del desarrollo y migración endotelial, regulación del tono vascular, papel como neurotransmisor en el sistema nervioso central, acciones antiinflamatorias, inhibir la síntesis de ADN y la mitosis celular, evitar los procesos trombóticos, al igual que la adhesión molecular y apoptosis (Cuéllar Mata et al., 2010; Elíes Gómez, 2009). En el organismo humano, el NO se produce por diversas células a partir del aminoácido L-arginina mediante la enzima óxido nítrico sintasa (NOS, por sus siglas en inglés), de la cual se conocen 3 isoformas en diferentes tejidos y se ha reportado una cuarta isoforma en las mitocondrias (Cuéllar Mata et al., 2010). La tabla 5 describe las principales isoenzimas NOS y su localización.

Tabla 5. Descripción de isoformas de NOS. La nomenclatura se describe a partir del orden de purificación de la enzima (Cuéllar Mata et al., 2010; Elíes Gómez, 2009).

Nombre corto	Nomenclatura	Localización	Actividad
nNOS	NOSI	Tejido nervioso	Producen NO en el citoplasma de las células de manera continua por periodos cortos y en cantidades pequeñas. Presentes en neuronas del sistema nervioso central y periférico.
iNOS	NOSII	Forma inducible	Las células sintetizan NO en respuesta a un estímulo en cantidades mayores y por tiempos prolongados durante procesos patológicos. Presente en diversas células y capaz de derivar efectos citotóxicos.
eNOS	NOSIII	Cara interna de los vasos sanguíneos o endotelial	Producen NO en el citoplasma de las células de manera continua por periodos cortos y en cantidades pequeñas. Presente en células endoteliales y mesangiales renales.

Es importante destacar que, dada su alta reactividad, en condiciones fisiológicas el NO se sintetiza en bajas cantidades y tiene una vida media de 0.5 a 5 s (Cuéllar Mata et al., 2010). De esta manera, la falta de producción o disponibilidad de NO se asocia con diferentes enfermedades neurodegenerativas o del sistema inmune por mencionar algunas; por otra parte, en condiciones fisiopatológicas, la cantidad elevada de NO* que se produce principalmente por la iNOS incrementa la producción de radicales libres por reacciones inespecíficas de nitración, nitrosilación y de oxidación (Cuéllar Mata et al., 2010; Elíes Gómez, 2009). Por ejemplo, el NO puede reaccionar con derivados del oxígeno, como oxígeno molecular, superóxido e hidroxilo que son y producen compuestos altamente tóxicos, tales como peroxinitritos, nitritos, nitratos, entre otros, que finalmente desencadenan en apoptosis (Elíes Gómez, 2009).

El Kit de ensayo de nitritos con reactivo de Griess (Sigma-Aldrich) se utilizó para cuantificar la cantidad de nitritos liberada por el cultivo celular. Primero, este reactivo reacciona con el nitrito de las muestras y lo reduce a óxido de nitrógeno (NO_2); después, el NO_2 reacciona y forma un compuesto color púrpura; de esta manera, se puede observar de manera cualitativa y cuantitativa con la lectura de intensidad (abcam, 2020). Primero, se realizó una solución de nitrato de sodio (Sigma-Aldrich) al 10 mM en PBS 1X (NaNO_3/PBS); después, 10 μL de dicha solución se mezclaron con 990 μL de PBS 1X para obtener una solución 100 μM . Posteriormente, 4 g del reactivo Griess se diluyeron en 10 mL de agua mili-Q y la solución se sonicó por 5 min. En una placa de 96 pocillos se colocaron 100 μL de la solución NaNO_3/PBS (100 μM) por triplicado en la fila A. Se agregaron 50 μL de PBS 1X en las columnas B-H, también por triplicado. Después, se realizaron 6 diluciones en serie por triplicado, de tal manera que se tomaron 50 μL de los pozos de A y se mezclaron con los pozos de B, se resuspendió y se realizó el mismo procedimiento hasta los pozos G. De esta manera, se obtuvo un volumen final de 50 μL en cada pozo con un rango de concentración de NO_2 de 0-100 μM , como muestra la siguiente figura:

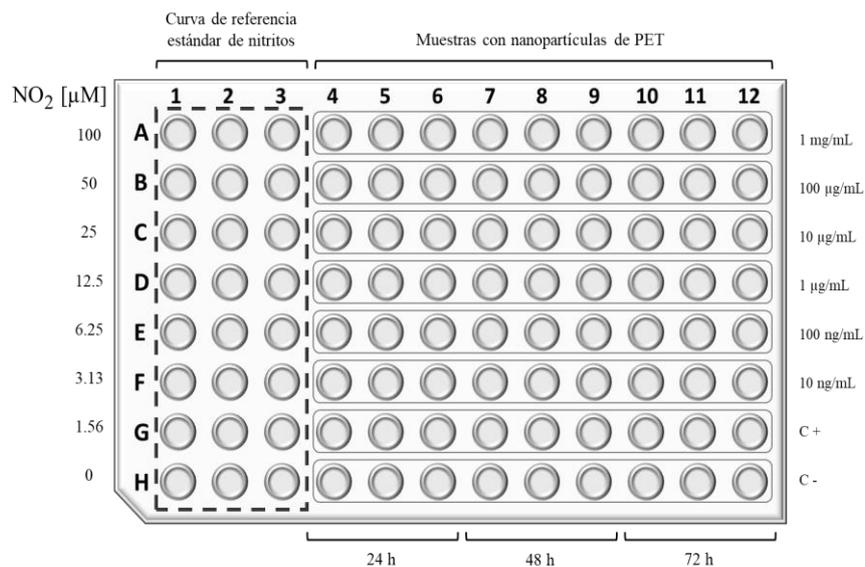


Figura 16. Distribución de la curva de referencia de dióxido de nitrógeno para el ensayo de nitritos y de las muestras con partículas de PET en una placa de 96 pocillos.

Después, se recuperaron 50 μL del sobrenadante de los pozos de un ensayo de viabilidad de 3 días y se dispusieron por triplicado en los pozos correspondientes por cada concentración de partículas de PET y por cada día. Se agregaron 50 μL de la solución de Griess a los pozos de la curva de referencia, así como a los pozos con las diferentes concentraciones de PET. Se incubó durante 20 min a 30°C y se realizó la lectura de los valores de absorbancia utilizando un espectrofotómetro UV-VIS para microplacas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO) a 540 nm. Finalmente, se realizó regresión lineal con los valores de la curva de referencia para conocer la concentración de nitritos en las muestras, utilizando Microsoft Excel.

3.2.3 Modelo de nitroprusiato de sodio

Para verificar que la estimación del ensayo de nitritos no se viera modificado por acción de las nanopartículas de PET y que los datos obtenidos se relacionaran directamente con las condiciones celulares, se propuso utilizar nitroprusiato de sodio ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como modelo para observar la capacidad de absorción de sustancias por parte de las nanopartículas.

Se monitoreó el cambio de concentración del nitroprusiato de sodio respecto al tiempo al estar únicamente en contacto con las nanopartículas de PET, de tal manera que una diferencia en la concentración final respecto a la inicial sería atribuible a la interacción del compuesto con las nanopartículas. Para ello, primero se mezclaron 50 μL de una solución con concentración de 20 mg/mL de nitroprusiato de sodio (Sigma-Aldrich) con 950 μL de PBS 1X para obtener una concentración de 1 mg/mL. Por otra parte, se realizó una solución con concentración de 1 mg/mL de partículas de PET mezclando 100 μL de la solución madre (10 mg/mL) con 900 μL de DMEM. Se centrifugó a 13,300 rpm por 30 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de PBS 1X; después, se agregaron 100 μL de nitroprusiato de sodio de concentración 1 mg/mL y se mezcló vigorosamente. Después, se centrifugó a 13,300 rpm por 30 min a 4°C y se realizó la lectura de absorbancia con el sobrenadante a 395 nm, utilizando el espectrofotómetro para microplacas ya mencionado y realizando la lectura de 1 mL de PBS como blanco.

La solución de partículas de PET con nitroprusiato de sodio se incubó a 30°C, cubierta con papel aluminio y con agitación constante durante 7 días. Cada 24 h se centrifugó la solución a 13,300 rpm por 30 min a 4°C para realizar la lectura de absorbancia del sobrenadante bajo las condiciones ya mencionadas. Después de cada lectura, se regresó el sobrenadante y se resuspendió. Finalmente, los datos fueron procesados utilizando Microsoft Excel.

3.2.4 Detección y cuantificación de proteínas totales

Para determinar la cantidad de biomasa presente en las muestras, se estimó la concentración total de proteínas con el Kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™ (Thermo Scientific™). El fundamento para este ensayo es que en un medio alcalino las proteínas reducen Cu^{2+} a Cu^{1+} , lo cual es conocido como reacción de Biuret; el ácido bicinconínico (BCA, por sus siglas en inglés) forma un complejo hidrosoluble color púrpura con el Cu^{1+} . Dicho complejo tiene una absorción máxima a 562 nm y absorbe de manera lineal con el incremento de proteína, por lo que sus valores son proporcionales (PB-L, 2021). En este ensayo se evaluó la diferencia entre la cantidad de proteína de las células expuestas a una concentración de 10 ng/mL de partículas de PET respecto a células de control positivo C+ (sin presencia de partículas de PET) por 24, 38 y 72 h.

Primero, se colocaron 20,000 células por pozo en 18 pozos de una placa de 24 pocillos con un volumen final de 2 mL por pozo. A 9 pozos se les agregó 10% (v/v) de partículas de PET en concentración de 10 ng/mL y los pozos restantes se mantuvieron como C+. Cada 24 h

se levantaron las células de los pozos con partículas de PET y C+ correspondientes al tiempo de incubación. Para ello, se agregó 1 mL de tripsina/EDTA y se incubaron por 5 min a 37°C y 5% CO₂; se agregaron 2 mL de DMEM suplementado y se recuperó el medio en un tubo eppendorf. Se centrifugó a 1,500 rpm durante 5 min y se desechó el sobrenadante. Finalmente, se agregó 1 mL de PBS 1X y se almacenaron, sin resuspender, a - 80°C.

Para determinar la concentración de proteína con este método, es necesario partir de una referencia con concentraciones conocidas, por lo que se realizó una curva de referencia de concentración de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) como indica el protocolo del fabricante. Para ello, se utilizaron los siguientes reactivos incluidos en el kit: solución madre de BSA (2 mg/mL), reactivo A y reactivo B para ensayo de proteína BCA. Para obtener la solución de trabajo para la cuantificación de proteínas, se preparó una solución de 7.65 mL con una proporción 50:1 del reactivo A y B correspondientemente. La solución se tapó con aluminio y se guardó en refrigeración. Con la solución madre de BSA se realizaron diluciones con PBS para obtener las siguientes concentraciones: 250 µg/mL, 125 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 5 µg/mL y 0 µg/mL; 25 µL de cada una de estas concentraciones se colocaron por triplicado en una placa de 96 pocillos. Se descongelaron las células almacenadas a - 80°C y se sonicaron en un ultrasonificador (Sonics & Materials VC-750 Vibra-Cell) por 1 min y 10 s, con pulsos de 9.9 de encendido y apagado con amplitud al 26%; 25 µL de las soluciones obtenidas se colocaron por triplicado en la placa de 96 pocillos. Se agregaron 200 µL de la solución de trabajo a todas las muestras de la placa, incluyendo las muestras de BSA. Por último, se incubó a 30°C durante 30 min y se midió la absorbancia de cada muestra a 562 nm utilizando un espectrofotómetro para microplacas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO). La figura 17 muestra el arreglo de la microplaca de 96 pocillos con las muestras de BSA y las muestras de las células sonicadas.

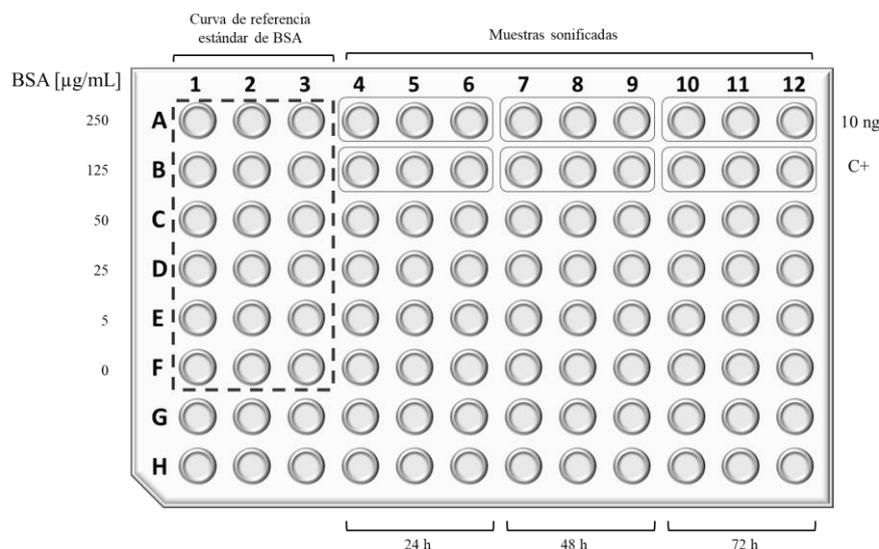


Figura 17. Distribución de la curva de referencia de BSA para el ensayo de proteína y de las muestras sonicadas en una placa de 96 pocillos.

3.2.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los ensayos anteriores con $n = 3$ fueron analizados con el Software Origin 9 para obtener el promedio y desviación estándar, así como mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) y con el Método Tukey ($p < 0.05$) para determinar las diferencias significativas. Posteriormente fueron graficados con GraphPad Prism 8.2.1.

3.2.6 Tinción de nanopartículas de PET y seguimiento por microscopía fluorescente

El término fluorescencia describe un fenómeno por el cual las moléculas pueden emitir luz por cortos periodos después de haber sido excitadas por luz de mayor energía (Samaniego, 2009). La microscopía fluorescente utiliza una lámpara de mercurio o de xenón como fuente de luz para excitar electrones de moléculas fluorescentes, tales como fluoróforos, que estén presentes en una muestra (López-Macay et al., 2016). Con la extracción de proteínas fluorescentes, tales como la GFP, y el desarrollo de ingeniería genética, es posible el monitoreo de células vivas mediante el marcaje de sus componentes celulares (Samaniego, 2009). Aprovechando las virtudes de esta técnica, las partículas de PET se tiñeron con el colorante rojo Nilo, una sustancia fluorescente, para evaluar con mayor precisión su localización al interactuar con las células.

Primero, en un tubo eppendorf se mezclaron 10 mg de partículas de PET en 1 mL de etanol absoluto y se mezcló vigorosamente como método de limpieza. Después, se centrifugaron a 13,300 rpm durante 25 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 mL de agua mili-Q. Se preparó una solución con 0.5 mg de colorante rojo Nilo (Sigma-Aldrich) en 1 mL de DMSO y se añadieron 150 μ L de dicha solución a las partículas de PET. Las partículas se incubaron a 30°C durante 24 horas, con agitación constante y en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó a 13,300 rpm por 30 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de etanol 70%. Para eliminar el excedente de colorante, se centrifugó dos veces más bajo las mismas condiciones, desechando el sobrenadante y resuspendiendo en 1 mL de DMEM suplementado. El tubo eppendorf con las partículas de PET teñidas se cubrió con papel aluminio y se ultrasonificó por 5 min.

Después se realizó una dilución para obtener una solución de concentración de 1 mg/mL de nanopartículas de PET teñidas. Se colocaron 25,000 células en una caja de Petri de 3 cm de diámetro y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ por una noche. Posteriormente, se les agregó 20 μ L (30% v/v) de partículas de PET teñidas de concentración 1 mg/mL y se incubaron durante 5 días. Por dos días, se les tomó una micrografía cada 24 h, incluyendo la hora 0, con un microscopio fluorescente (Etaluma LS720) y el software Lumaview720 en campo claro, fluorescencia verde y roja con una magnificación 10x. Estas células se mantuvieron en incubación hasta tomar las últimas micrografías a las 120 h (quinto día).

De igual forma, se preparó una caja de Petri de 3 cm de diámetro con 50,000 células y se incubaron a las condiciones ya mencionadas por una noche; después, se les agregó 100 μL de partículas de PET teñidas de concentración de 1mg/mL. Utilizando el mismo microscopio fluorescente y su respectivo software, se tomaron micrografías de campo claro, fluorescencia verde y roja, cada 2 min por 4 horas, manteniendo la temperatura a 37°C y con una magnificación de 40x. Para facilitar la toma de imágenes en diferentes zonas, se programó un protocolo que tomó las micrografías de manera automática cada 2 min en zonas particulares previamente seleccionadas. Finalmente, se recopilaron las micrografías, se distribuyeron por zona y se realizaron videos para observar el comportamiento de las células en la primera hora de exposición a las nanopartículas de PET. Dichos videos fueron procesados empleando Windows Live Movie Maker y Sony Vegas Pro 13.0.

3.2.7 Seguimiento de partículas de PET por microscopía confocal

Al igual que los microscopios de fluorescencia, en la microscopía confocal también se hace uso de esta propiedad para obtener imágenes con mayor resolución espacial; el nombre de esta técnica se refiere al uso de la confocalidad para analizar un plano particular de la muestra o espécimen (López-Macay et al., 2016). Actualmente es una herramienta de amplio uso en la investigación biomédica ya que permite analizar marcados múltiples en células o tejidos (Samaniego, 2009).

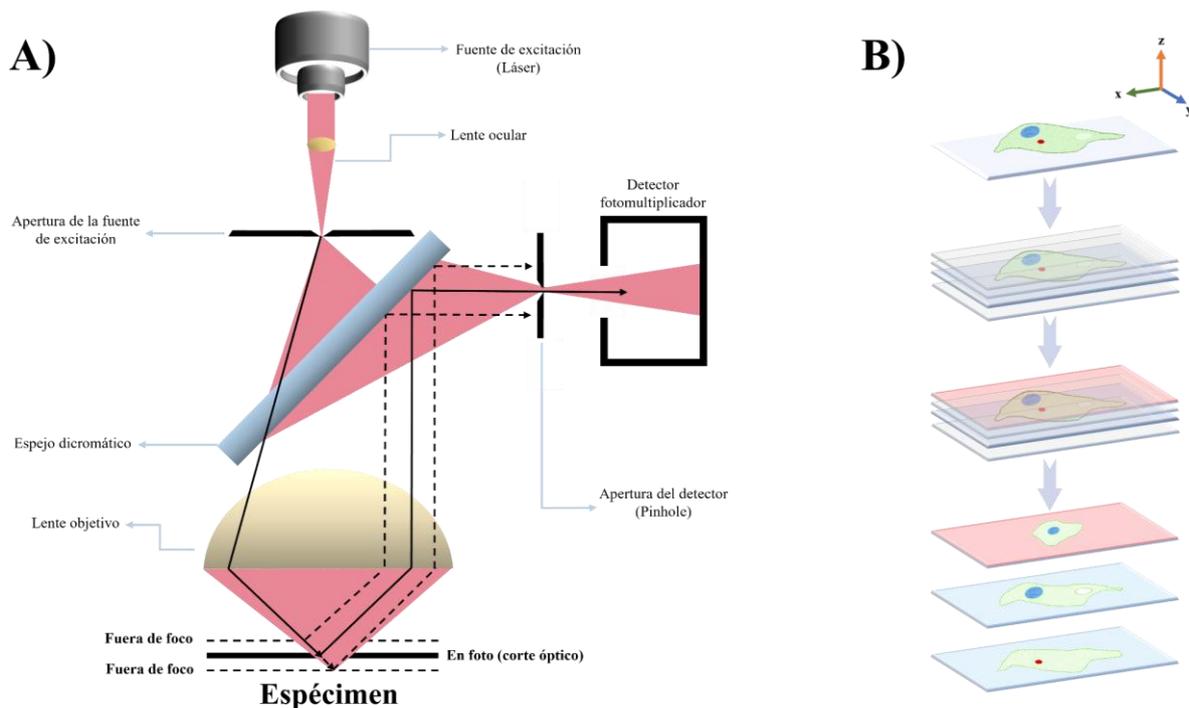


Figura 18. **A)** Diagrama del sistema de un equipo de microscopía confocal; las flechas representan la filtración y el reflejo de la luz láser que impacta con el espécimen en el plano correspondiente al corte óptico que se está analizando. **B)** Esquema que representa el tipo de imágenes que se pueden obtener al analizar las muestras en diferentes planos focales; la ilustración representa una célula fijada en un portaobjetos, con el núcleo teñido de azul, el citoesqueleto de verde y una partícula sintética de color rojo. Por su posición, se determina que la partícula se encuentra dentro de la célula, en la parte inferior.

La figura 18A esquematiza los componentes que conforman el sistema para microscopía confocal, cuya principal diferencia con los de fluorescencia es el empleo de un láser como fuente de luz; el láser pasa por una pequeña apertura hacia un espejo dicróico que únicamente refleja la luz que incide a 45°. Después, la luz reflejada es recibida por el lente objetivo, el cual permite enfocar el rayo de luz hacia el plano focal del espécimen. La fluorescencia de la muestra es entonces reflejada al espejo dicróico y redirigida a una segunda apertura o *pinhole* que impide el paso de la fluorescencia que se originó por los planos fuera de foco. Así, únicamente la fluorescencia que proviene del plano focal llega al detector fotomultiplicador, lo cual permite adquirir imágenes que representan secciones ópticas a lo largo del eje z, como se representa en la figura 18B. De hecho, esta cualidad representa una de las grandes ventajas de esta técnica, ya que después se pueden realizar reconstrucciones tridimensionales al agrupar cortes ópticos continuos que se obtienen sin dañar las muestras reales (López-Macay et al., 2016; Samaniego, 2009).

El proceso empleado para analizar las células que estuvieron expuestas a las nanopartículas de PET con esta técnica fue el siguiente. Se limpiaron 4 cubreobjetos circulares de vidrio con agua y jabón; después, bajo la campana de flujo laminar, se limpiaron con alcohol 70% y se esterizaron bajo luz ultravioleta por 15 min. Un cubreobjetos circular se colocó en una caja de Petri de 3 cm de diámetro y se funcionalizó con 1.5 mL de solución de poli-L-lisina al 10% en PBS 1X durante 20 min. Después, se retiró el sobrenadante y se dejó secar. Se agregaron 25,000 células encima del cubreobjetos, se esperó unos minutos y se agregó 3 mL de medio DMEM suplementado. Las células se incubaron por toda la noche, a 37°C y 5%CO₂ y posteriormente se agregaron 7.5 µL de partículas de PET (concentración de 10 mg/mL) teñidas con rojo Nilo. Se realizó nuevamente un seguimiento de la interacción de las partículas de PET con las células mediante microscopía fluorescente (Etaluma LS720) manteniendo las condiciones de temperatura y CO₂ de incubación y utilizando el software Lumaview720 para tomar una micrografía cada 2 minutos por una hora y media.

Pasado el tiempo de análisis, se prosiguió a fijar las células; se retiró el medio de cultivo y se agregaron 1.5 mL de glutaraldehído al 0.04%. La caja de Petri se cubrió con papel aluminio y se guardó en refrigeración por una noche. Después, el glutaraldehído se desechó y se agregó 1 mL de PBS 1X y se guardó en refrigeración nuevamente. Al día siguiente, se realizó una solución de Triton X-100 al 0.3%, mezclando 90 µL de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) con 30 mL de PBS 1X. Esta solución sirvió para realizar las siguientes soluciones: una solución de BSA al 2% (300 µL de BSA con una concentración inicial de 5 mg/mL con 15 mL de la solución de Triton X-100 al 0.3%), una solución de DAPI de 1 mL de DAPI (Santa Cruz Biotechnology) con concentración inicial de 1 mg/mL con 40 µL de la solución de Triton X-100 al 0.3% y una solución de 40 µL de Triton X-100 al 0.3% con 0.4 µL de anti-N-cadherina (Alexa Fluor 546 ® Santa Cruz Biotechnology).

Después, al cubreobjetos circular se le realizaron los siguientes lavados: 2 lavados con PBS 1X, uno con Triton X-100 al 0.3% y otro con la solución de BSA al 2%. Se agregaron 40 μ L de la solución con anti-N-cadherina y se incubó a 30°C por 1 h. Concluido el tiempo de incubación, se realizaron nuevamente 2 lavados con PBS 1X y uno con Triton X-100 al 0.3%. Se agregó 1 mL de la solución de DAPI encima del cubreobjetos y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Mientras tanto, se realizó una solución 50/50 de glicerol absoluto (Sigma-Aldrich) con PBS 1X. Después del tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS 1X; se colocó una gota de la solución de glicerol en un portaobjetos y se colocó encima el cubreobjetos circular. Los bordes del cubreobjetos se sellaron utilizando esmalte de uñas transparente. El portaobjetos se guardó en una caja de Petri de 6 cm de diámetro, cubierto de aluminio en refrigeración. El seguimiento por microscopía confocal se llevó a cabo con un microscopio Olympus Fluoview, FV-1000 con magnificación de la lente objetivo a 60x y empleando los parámetros de la tabla 6 para medir la excitación y emisión de los marcadores utilizados. Finalmente, las imágenes se procesaron con el software FV10-ASW Viewer 4.2b y con ImageJ para la medición de las partículas presentes en las micrografías.

Tabla 6. Parámetros de excitación y emisión de los marcadores empleados para identificar los componentes celulares y las partículas de PET.

Sustancia	Descripción del marcaje	Longitud de onda de excitación [nm]	Longitud de onda de emisión [nm]
GFP	Tinción del citoesqueleto de las células MDA-MB-231	488	510
DAPI	Tinción de color azul en los núcleos celulares	405	461
Anti-N-cadherina	Tinción de color naranja en las N-cadherinas transmembranales	543	612
Rojo Nilo	Tinción de color rojo con la cual se tiñeron las nanopartículas de PET	543	612

Capítulo IV: Resultados

4.1 Caracterización de nanopartículas de PET

Posterior a la síntesis de las nanopartículas de PET, se llevó a cabo la caracterización de éstas mediante dispersión dinámica de luz (DLS). Se realizaron mediciones por triplicado sobre la distribución de tamaño de los medios que se emplearon a lo largo de los experimentos como control y después con la adición de 10 µg/mL de nanopartículas de PET (concentración de 100 µg/mL). La figura 19, mostrada en el anexo, muestra la distribución de tamaño representada como diámetro hidrodinámico (d.nm) que se obtuvo en las diferentes muestras, denotando las gráficas de los controles con color gris y las de los medios adicionados con nanopartículas de PET con color negro. Se destaca que la figura 19A muestra la distribución de tamaño de las nanopartículas de PET en agua destilada para observar su comportamiento en un medio cuya composición no propicia la formación de coronas. Para una mejor visualización, los promedios de tamaño y de potencial Z están representados en la siguiente tabla.

Tabla 7. Tamaño (diámetro hidrodinámico) y potencial Z de los medios empleados en los experimentos sin y con nanopartículas de PET en su contenido. Los datos son reportados como valores promedio \pm SD (n=3). Los medios suplementados contienen 1% antibiótico-antimicótico y 10% SFB.

MEDIO	Tamaño (d.nm)		Potencial Z (mV)	
	Control	PET	Control	PET
Agua destilada	1.23×10^4	1,990.00	-4.98 ± 4.86	-42.8 ± 5.32
DMEM solo	$1,218.33 \pm 24.38$	715.7 ± 23.4	-12.4 ± 0.46	-18 ± 0.96
DMEM suplementado	114.14 ± 0.47	100.3 ± 3	-18.93 ± 1.33	-12.5 ± 1.04
MEM solo	109.87 ± 0.15	114.1 ± 3.7	-11.57 ± 0.57	-10.35 ± 0.69
MEM suplementado	126.40 ± 1.32	101.0 ± 0.6	-12.17 ± 0.4	-10.89 ± 1.06
PBS 1X	544.27 ± 41.57	970.1 ± 139.4	-7.42 ± 1.9	-18.27 ± 1.7
SFB (50%)	34.05 ± 4.45	32.1 ± 6.7	-8.33 ± 0.06	-9.3 ± 1.31

En primer lugar, se observa que en agua destilada el tamaño promedio de las nanopartículas de PET es de 1,990 nm de diámetro. Si bien es un tamaño promedio bastante grande, este valor no se repite en ningún caso cuando las nanopartículas se encuentran en los demás medios. De esta manera, los valores de tamaño altos cuando se agrega el PET, como el mostrado en agua destilada, PBS 1X y DMEM solo (sin suplementar) se atribuyen a agregados de nanopartículas de PET, así como al tamaño de las partículas constituyentes de estos medios, ya que los controles también denotan un tamaño elevado. En el caso del SFB al 50%, se muestra un tamaño promedio muy bajo (de 34.05 nm y de 32.1 nm sin y con la adición de nanopartículas de PET respectivamente), sin embargo, en la distribución de tamaño que se observa en la figura 19G del anexo es notable la presencia de picos solapados con valores representativos a 8, 50, 229 y 5,000 nm, por lo que se tiene una distribución de tamaño más amplia que contempla valores muy grandes en comparación con los demás.

Por otra parte, el DMEM suplementado, MEM solo y MEM suplementado muestran tamaños ligeramente por encima de 100 nm. De hecho, al observar las gráficas de distribución de tamaño, la presencia de diámetros de aproximadamente 100 nm en todos los medios es evidente, incluso en el agua destilada. Además, se observan dos comportamientos al comparar los valores de los controles respecto a los valores obtenidos con la adición de nanopartículas de PET. Para el DMEM solo, DMEM suplementado, MEM suplementado y SFB (50%), el tamaño disminuye al agregar las nanopartículas de PET a los medios en un -41.26%, -12.13%, -20,12% y -5.66% respectivamente de sus controles. En el caso del MEM solo y el PBS 1X el tamaño promedio aumenta al agregar las nanopartículas de PET en comparación con los valores control en 3.88% y 78.24% correspondientemente, además de que son estos medios los que presentan el menor y mayor cambio de todos. Para fines experimentales, se denota que tanto el DMEM suplementado como el MEM suplementado muestran una distribución de tamaño bastante similar con la adición de nanopartículas de PET, por lo que el uso alternado de estos medios en el cultivo celular no supone un riesgo en la comparabilidad de los datos que se obtengan.

Respecto al potencial Z, se observa que todos los medios control tienen un valor más negativo que el obtenido para el agua destilada, lo cual en un principio concuerda con el déficit de sales y otros iones que tiene este medio en comparación con los demás. Al agregar PET, el valor del potencial Z incrementa abruptamente en el agua destilada hasta -42.8 mV y todos los medios muestran un valor menos negativo en comparación a este. En el DMEM solo, PBS 1X y SFB (50%) se presenta un incremento en el valor del potencial Z respecto al de sus controles, siendo el PBS 1X el que tiene mayor cambio con la adición de nanopartículas, mientras que en el caso del DMEM suplementado, el MEM solo y el MEM suplementado hay un decremento.

4.2 Evaluación de la toxicidad de las nanopartículas de PET

A continuación, se describen los resultados hallados a partir de los ensayos de viabilidad, liberación/ absorción de nitritos y de proteína. De igual manera, se presentan las micrografías obtenidas por microscopía fluorescente y confocal.

4.2.1 Ensayo de viabilidad y proliferación

La figura 20, situada en la parte de anexos, muestra el resultado colorimétrico que tuvo un ensayo de viabilidad de 3 días con células MDA-MB-231 en presencia de concentraciones de nanopartículas de PET que van desde 10 ng/mL hasta 1 mg/mL y dos controles (C+ y C-). Mayormente se observa una coloración rosa o púrpura correspondiente a la presencia de resorufina, mientras que C- mantiene un color azulado. Los datos que representan la viabilidad de las células por 7 días para las concentraciones de nanopartículas de PET empleadas, así como para sus controles, se encuentran graficados en la siguiente figura, donde los valores fueron normalizados respecto a C+.

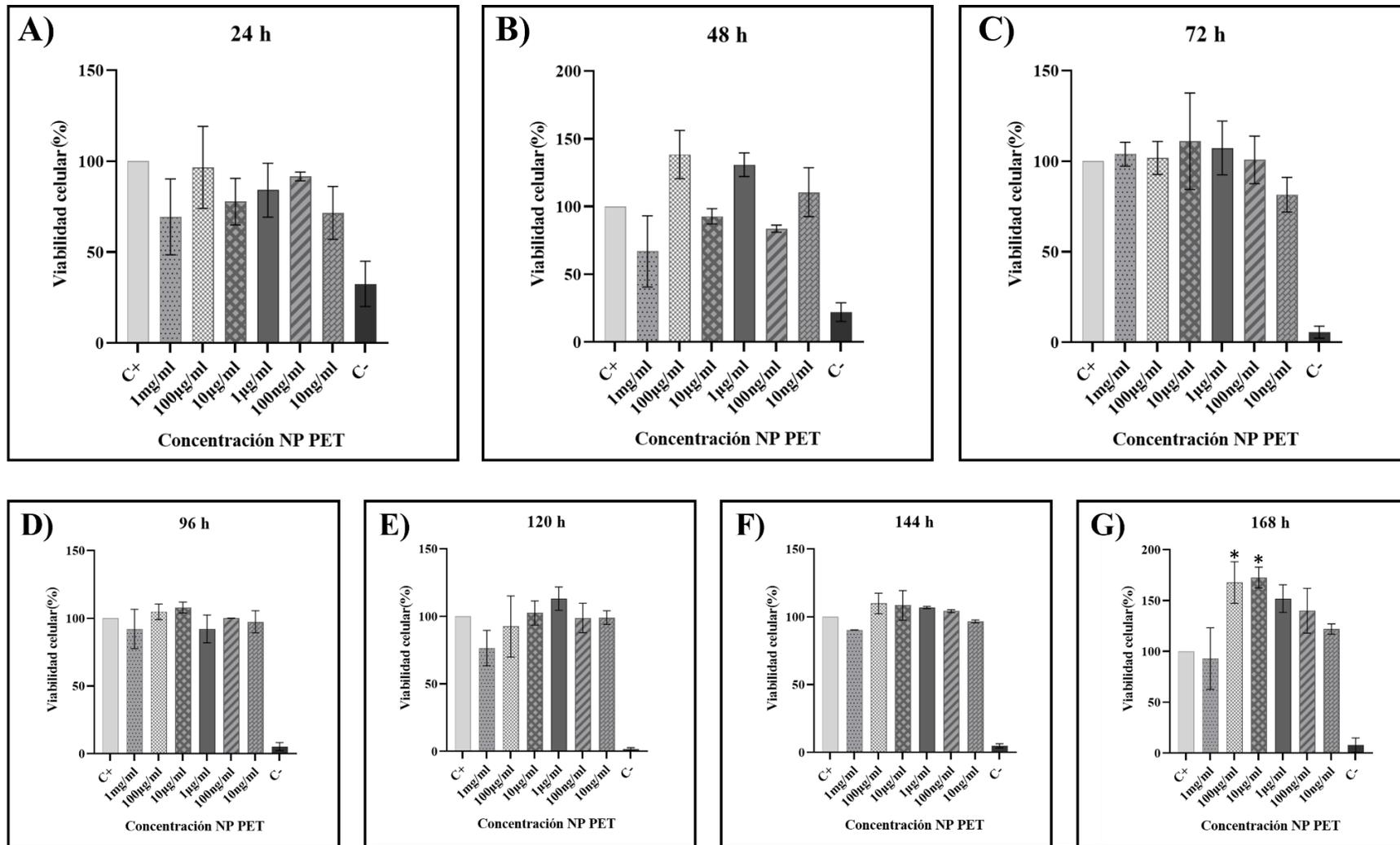


Figura 21. Gráficas que representan la viabilidad de células MDA-MB-231 en presencia de nanopartículas de PET en concentraciones que van desde 1 mg/mL hasta 10 ng/mL durante **A)** 24 h, **B)** 48 h, **C)** 72 h, **D)** 96 h, **E)** 120 h, **F)** 144 h y **G)** 168 h. Los datos contienen SD con $n = 3$. Los símbolos * denotan diferencias significativas con $p < 0.05$ respecto a C+, mediante ANOVA y método Tukey.

La estimación del porcentaje de viabilidad celular (eje de ordenadas en la figura 21) está relacionada con la intensidad de fluorescencia de la resorufina, compuesto que se obtiene a partir de la reducción de resazurina por parte de las células viables. El trabajo de Aguilar-Guzmán y colaboradores (2022) establece que las nanopartículas de PET sintetizadas por la metodología empleada en este trabajo (Rodríguez Hernández et al., 2019) no producen fluorescencia al momento de hacer mediciones en ensayos de viabilidad con resazurina sin células, por lo que su presencia no afecta los resultados presentados.

Los efectos adversos en la viabilidad no muestran significancia hasta las 168 h. Si se considera el promedio, se observa que en las primeras 24 h prácticamente todas las muestras con nanopartículas de PET muestran disminución en el porcentaje de viabilidad celular. La desviación estándar de la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ indica que podría tener mayor viabilidad celular en comparación con C+ y por el otro extremo, las concentraciones de 10 ng/mL y 1 mg/mL son las que exhiben una disminución importante en comparación con el resto de las concentraciones. A 48 h, el comportamiento de la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ persiste y nuevamente exhibe mayor porcentaje de viabilidad celular respecto a C+, al igual que las concentraciones de 1 μg y 10 ng/mL , mientras que la concentración de 1 mg/mL sigue teniendo un efecto que disminuye la viabilidad, junto con las concentraciones de 100 ng/mL y 10 $\mu\text{g/mL}$.

A 72 h, la viabilidad celular muestra un incremento importante para todas las concentraciones, en especial para la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$. Si bien en todas se nota un incremento, la concentración de 10 ng/mL todavía exhibe una ligera disminución del porcentaje de viabilidad respecto a C+. A partir de las 96 h la viabilidad mejora considerablemente, de tal manera que el porcentaje de viabilidad de células expuestas a nanopartículas de PET se mantiene e incrementa por encima de C+ hasta las 168 h; con relación a ello, las concentraciones de 100 y 10 $\mu\text{g/mL}$ muestran diferencias estadísticamente significativas a las 168 h con un incremento en la viabilidad celular bastante marcado, mientras que la concentración de 1 mg/mL es la que presenta mayor inconsistencia al comparar la variación del porcentaje de viabilidad con las demás concentraciones, ya que a partir de las 120 h de exposición a esa concentración, la viabilidad no muestra mejora.

Así mismo, la figura 22 exhibe el cambio del porcentaje de viabilidad celular que cada concentración de nanopartículas de PET experimentó por 7 días para una mejor interpretación sobre los efectos que cada concentración manifiesta respecto al tiempo; de igual manera, las gráficas se encuentran normalizadas con C+, por lo que valores por encima o debajo de 0 indican respectivamente aumento o disminución en el porcentaje de viabilidad celular respecto a C+. El comportamiento del porcentaje de viabilidad respecto al tiempo tiende a disminuir en las primeras 24 h para todas las concentraciones y después aumenta gradualmente con el tiempo, a excepción de la concentración de 1 mg/mL , donde la viabilidad se encuentra por debajo de C+ durante los 7 días de exposición.

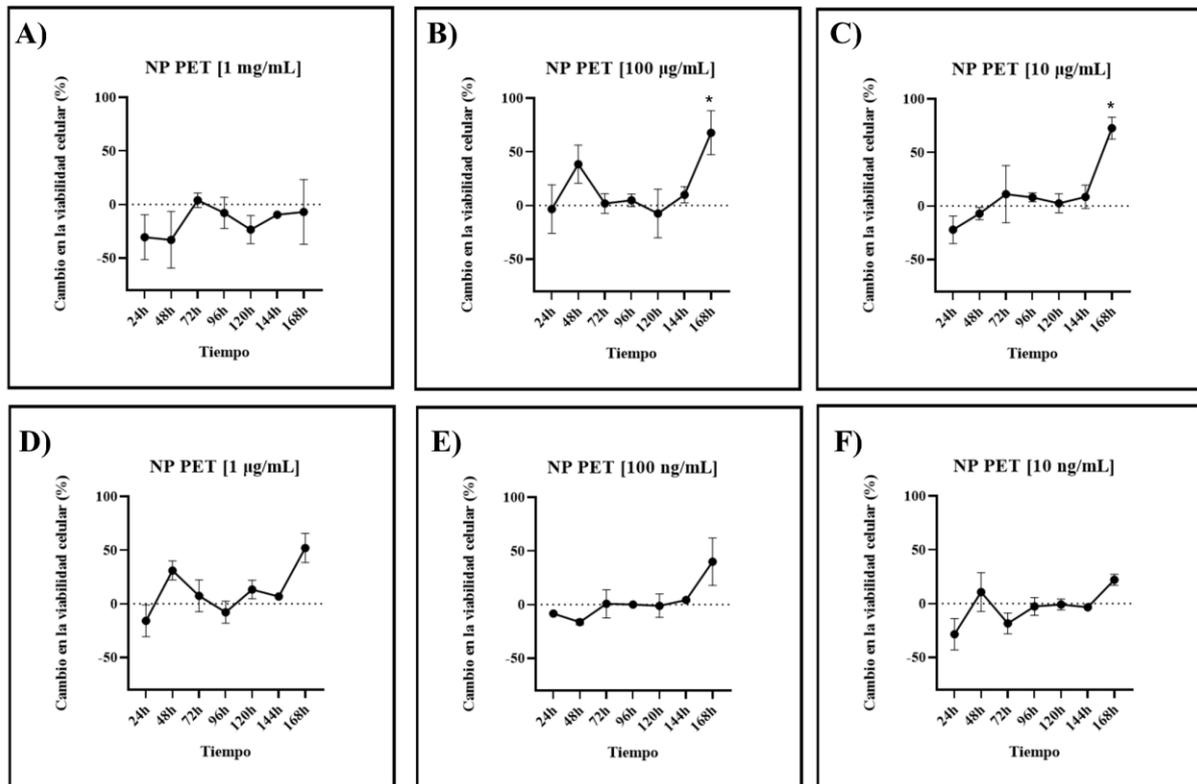


Figura 22. Esquemas del cambio del porcentaje de viabilidad celular que tuvieron en 7 días las células MDA-MB-231 expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de PET: **A)** 1 mg/mL, **B)** 100 µg/mL, **C)** 10 µg/mL, **D)** 1 µg/mL, **E)** 100 ng/mL y **F)** 10 ng/mL. Las gráficas se encuentran normalizadas respecto a C+ y contienen SD con n = 3. Los símbolos * denotan diferencias significativas con p < 0.05 respecto a C+, mediante ANOVA y método Tukey.

Las concentraciones de 100 µg/mL y 1 µg/mL, muestran una ligera disminución en la viabilidad a 24 h y posteriormente un aumento que se mantiene o rebasa los valores de C+ a lo largo de los 7 días. Las concentraciones de 10 µg/mL y 100 ng/mL presentan disminución en la viabilidad durante las primeras 48 h y después aumenta respecto al tiempo, mientras que la concentración de 10 ng/mL es la que presenta más cambios a lo largo de la semana, donde se presenta disminución en la viabilidad en las primeras 24 h, después un aumento por encima del control a 48 h, nuevamente decrece hasta las 144 h de exposición y finalmente aumenta a 168 h.

La figura 23, situada en el anexo exhibe las micrografías obtenidas mediante microscopía fluorescente de un ensayo de viabilidad de 3 días cada 24 h para los controles empleados: sin tratamiento como C+ y con 10% DMSO como C-, así como las micrografías recuperadas para las concentraciones de 1 µg/mL y 100 ng/mL ya que estas no son representativas. En la figura 24 se exhiben las micrografías recuperadas en el mismo intervalo de tiempo de las células expuestas al resto de las concentraciones de nanopartículas de PET, las cuales se aprecian como manchas oscuras.

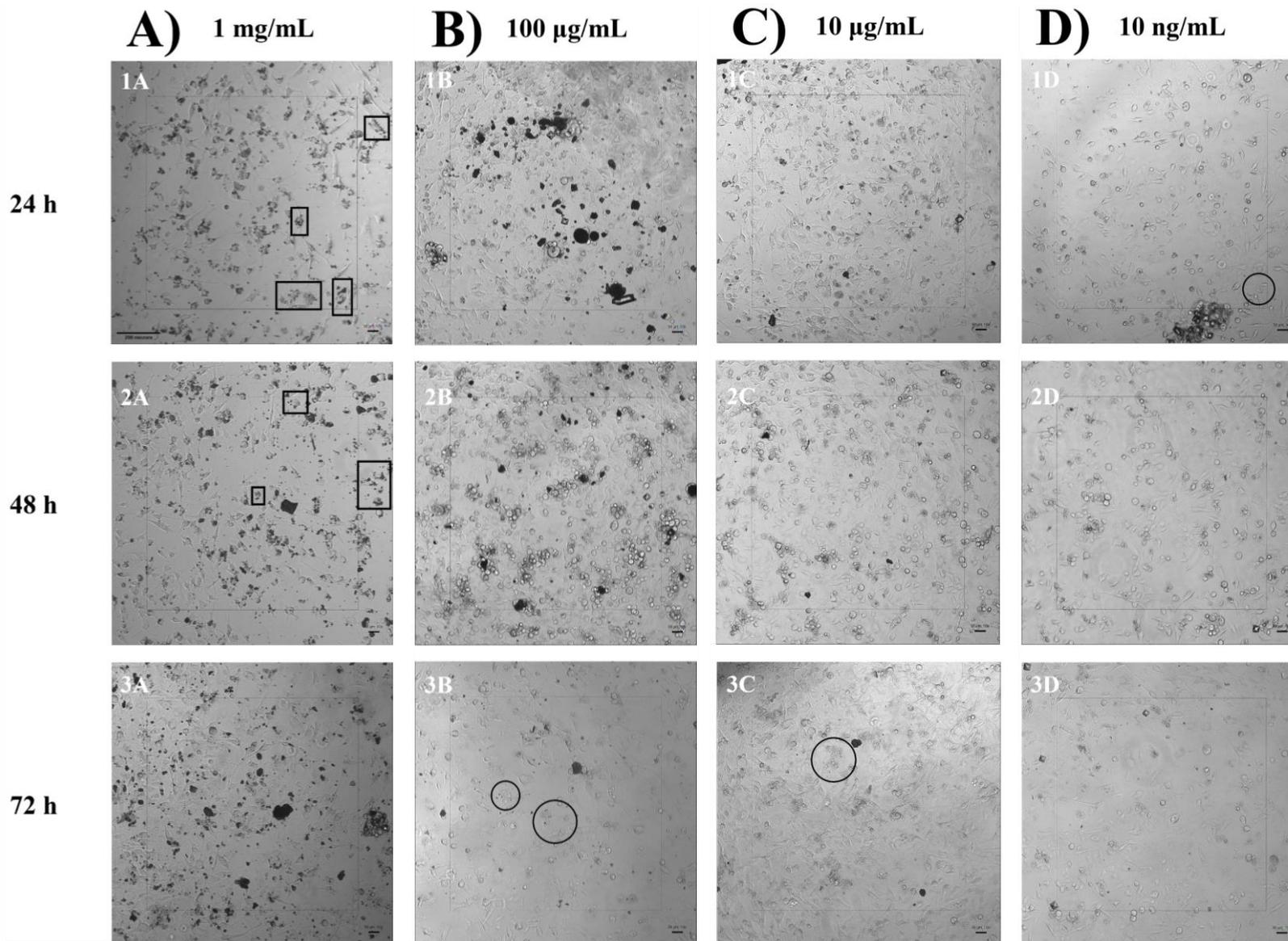


Figura 24. Micrografías obtenidas por microscopía fluorescente a 10x donde se exhiben los cambios morfológicos de las células MDA-MB-231 por un periodo de 3 días en presencia de nanopartículas de PET en concentraciones de **A)** 1 mg/mL, **B)** 100 µg/mL, **C)** 10 µg/mL y **D)** 10 ng/mL. Todas las micrografías tienen la misma escala. Los recuadros negros son indicativos para células cuya membrana se ve rodeada por partículas de PET, mientras que los círculos exhiben células con vesículas de gran tamaño o con alteración en la morfología de su membrana plasmática.

La formación de agregados de nanopartículas de gran tamaño es evidente en las concentraciones de 10 µg/mL, 100 µg/mL y 1 mg/mL, las cuales exhiben grandes manchas. Se observa que, desde las 24 h de exposición, existe internalización celular de las nanopartículas de PET, sobre todo de las nanopartículas de menor tamaño y para concentraciones altas tal como 1 mg/mL; este hecho se afirma debido a la presencia de manchas negras dentro de la región rodeada por la membrana celular. En general, la morfología de las células coincide con la del C+ para todas las concentraciones durante los 3 días, sin embargo, se observa una transición hacia morfología circular con una elevada proporción de células redondeadas que depende del tiempo y la concentración. La pérdida de la morfología se asocia a efectos adversos como se demuestra en la figura 23B para C-.

La concentración de 1 mg/mL exhibe la mayor cantidad de células con nanopartículas de PET en su interior respecto a las demás concentraciones. Otro efecto que se percibe es la adherencia o acumulación de nanopartículas de PET en la membrana celular, tal como se denota con los recuadros negros de las figuras 24-1A y 24-2A. En la figura mencionada se observa que las células tienen más de una nanopartícula de PET en su interior. A 72 h es notorio un incremento en la cantidad de células, tal como se establece en las gráficas de viabilidad, en las figuras 21A-C y 22A.

La concentración de 100 µg/mL presenta una gran cantidad de células redondeadas a las 48 h de exposición, donde la formación de agregados celulares es evidente y sobresaliente. Este comportamiento también se aprecia para las demás concentraciones, especialmente al mismo tiempo de 48 h pero en menor proporción; en todos los casos, a las 72 h la cantidad de células redondeadas disminuye. A partir de esta concentración, se pueden observar células que presentan vesículas de gran tamaño o daños en la morfología de la membrana celular, las cuales se indican con círculos. En el caso de las concentraciones de 100 y 10 µg/mL se observa este efecto a las 72 h, mientras que para las concentraciones de 1 µg/mL y 10 ng/mL muestran este efecto en las primeras 24 h.

Las micrografías de la figura 24-3B y 24-3C muestran la disminución y el incremento de células a las 72 h, lo cual corresponde a los valores obtenidos por el ensayo de viabilidad como muestra la figura 22B y 22C para las concentraciones de 100 y 10 µg/mL respectivamente. De igual manera, las micrografías de la figura 24-3D y 23-3D (situada en el anexo) representan el comportamiento de la disminución y aumento del número de células para las concentraciones de 10 ng y 100 ng como se evidencia en las figuras 22F y 22E. Además, se destaca que las concentraciones de 100 µg/mL y 100 ng/mL son las que muestran una mayor afectación a 48 h, dada la cantidad de células redondeadas y los agregados celulares que se observan. De esta manera, los ensayos de viabilidad denotan que las concentraciones de 1 mg/mL, 100 µg/mL y 100 ng tienen efectos adversos relevantes, mientras que la concentración de 10 ng/mL muestra un comportamiento singular en comparación con el resto.

4.2.2 Ensayo de liberación de nitritos

La figura 25A, mostrada en el anexo, muestra la curva patrón y la regresión lineal que se empleó para evaluar y determinar la cantidad de óxido nítrico presente en las muestras. Por su parte, en la figura 26 se encuentran graficados los valores de concentración de nitritos (NO_2^-) obtenidos de células MDA-MB-231 expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de PET por 3 días. Es importante destacar que la concentración de 10 ng/mL y el C- no presentan SD debido a que el reactivo se acabó antes de terminar los triplicados de estas muestras, por lo que solo se obtuvo un valor en la lectura de estos casos.

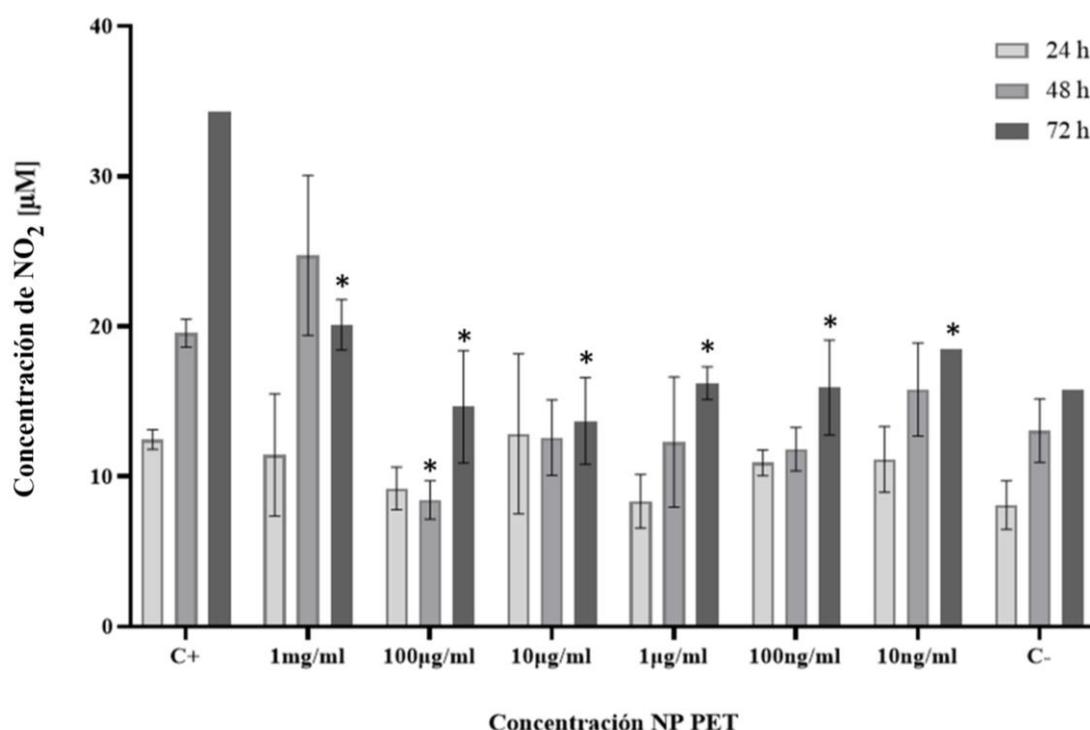


Figura 26. Gráficas de liberación de nitritos por células MDA-MB-231 expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de PET por un periodo de 3 días. Los datos se obtuvieron por espectrofotometría y contienen SD con $n = 3$. Los símbolos * denotan diferencias significativas con $p < 0.05$ respecto a C+, mediante ANOVA y método Tukey.

Como se observa, ambos controles indican que la concentración de NO_2^- tiende a ir en aumento respecto al tiempo; en el caso de C+, el aumento es abrupto mientras que para C- el aumento es en menor proporción. En particular, las concentraciones de 10 ng/mL, 100 ng/mL y 1 $\mu\text{g/mL}$ presentan el mismo comportamiento lineal; por otra parte, las concentraciones de 1 mg/mL, 100 y 10 $\mu\text{g/mL}$ muestran mayor afectación a 48 h.

A 24 h la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ es la que presenta mayor disminución, ya que la concentración de NO_2^- es 32% menor en comparación con C+. A 48 h la concentración de 1 mg/mL presenta valores por encima de C+, lo cual no se observa en ningún otro caso, mientras que la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ presenta los valores más bajos con diferencia significativa

al disminuir prácticamente el 60%. Por su parte, a 72 h todas las concentraciones exhiben diferencias significativas manteniendo valores por debajo de C+, donde las concentraciones de 1 mg/mL y 10 µg/mL son las de menor y mayor afectación respectivamente; se destaca que la concentración de 10 µg/mL fue la que presentó la menor variación en la cantidad de NO₂⁻ respecto al tiempo, cuya diferencia entre los valores mínimo y máximo es de 1.1 µM. Así, las concentraciones de 1 mg/ mL y 100 µg/mL son las que representan en mayor medida los efectos que tienen las células expuestas debido al cambio en la concentración de NO₂⁻

4.2.3 Modelo de nitroprusiato de sodio

Con el fin de estimar la influencia que pueden tener las nanopartículas de PET en la absorbancia de sustancias, tal como lo podrían ser los nitritos, se propuso evaluar el cambio en la concentración del compuesto nitroprusiato de sodio (Na₂[Fe(CN₅)NO]·2H₂O) cuando éste se encuentra expuesto con las nanopartículas a lo largo de un periodo.

La figura 27 muestra el comportamiento que tuvo el nitroprusiato de sodio respecto al tiempo, al estar expuesto a las nanopartículas de PET por un periodo de 7 días. La lectura de este ensayo se centra en los valores de absorbancia del nitroprusiato de sodio dado que son directamente proporcionales con la cantidad de esta sustancia que aún persiste en las muestras, mientras que la cantidad faltante se relaciona con los cambios químicos que puede tener esta sustancia y con la cantidad de nitroprusiato de sodio que ha sido absorbida directamente por las nanopartículas de PET.

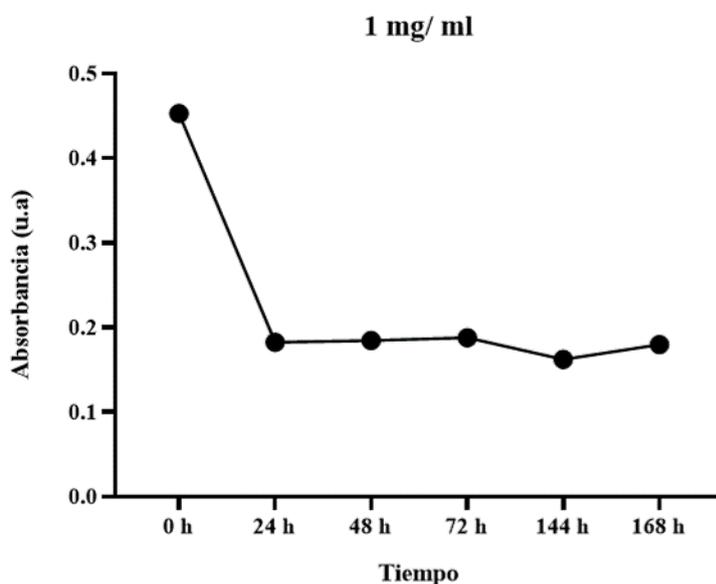


Figura 27. Datos obtenidos mediante espectrofotometría que representan el comportamiento del nitroprusiato de sodio (Na₂[Fe(CN₅)NO]·2H₂O) al estar expuesto a nanopartículas de PET por un periodo de 7 días en una solución de PBS 1X.

Se observa una disminución abrupta de aproximadamente el 60% del valor obtenido en la primera lectura (a 0 h) en las primeras 24 h; después de este tiempo, el valor de absorbancia no presenta cambios considerables y se mantiene hasta las 168 h, con una variación máxima del -4.4% a las 144 h. De esta manera, es notorio que sí existe una absorción inmediata de nitroprusiato de sodio por parte de las nanopartículas de PET, lo cual sucede en las primeras 24 h hasta un punto de saturación.

4.2.4 Detección y cuantificación de proteínas totales

La figura 25B, en el anexo, exhibe la curva patrón y la regresión lineal que se utilizó para determinar la cantidad de biomasa por medio de la cuantificación de proteínas en muestras usando la BSA como estándar. La figura 28 muestra la concentración de proteína presente en muestras de células MDA-MB-231 sin tratamiento (C+) y en aquellas expuestas a nanopartículas de PET de concentración de 10 ng/mL por un periodo de 3 días, así como su relación con los datos de fluorescencia, los cuales corresponden al número de células viables y a su proliferación. Esta concentración fue elegida debido a que es la concentración mínima con la que se observa afectación de manera particular en los ensayos de viabilidad.

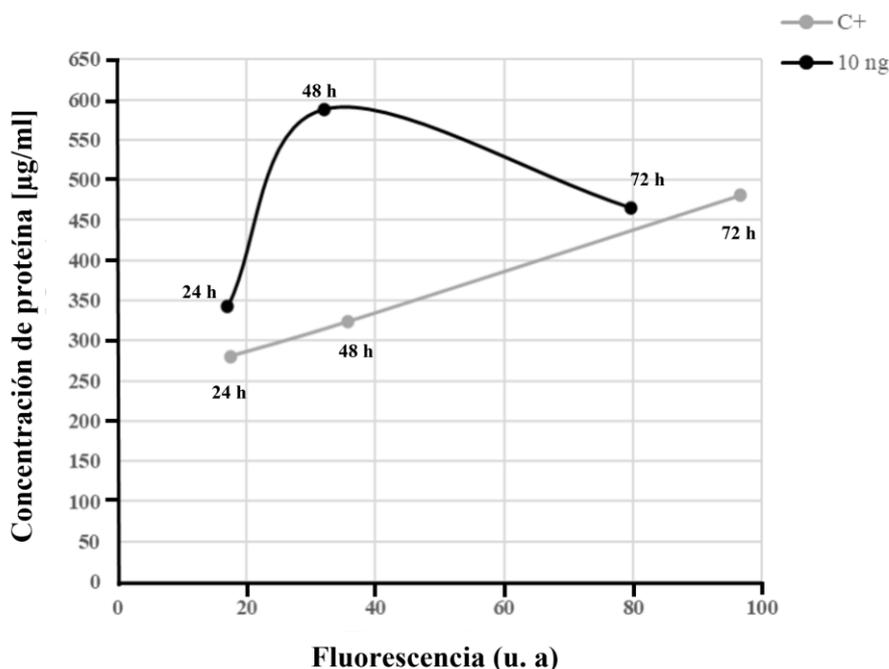


Figura 28. Datos obtenidos mediante espectrofotometría sobre cuantificación de biomasa a través de un ensayo de proteínas BCA para células MDA-MB-231 expuestas a 10 ng/mL de nanopartículas de PET y sin tratamiento (C+) por 3 días.

En la figura anterior se observa que la cantidad de proteína aumenta respecto al tiempo para C+, al igual que la fluorescencia, de tal manera que el comportamiento de ambas variables tiene una relación lineal. Las células expuestas a las nanopartículas de PET muestran un incremento en la cantidad de proteína desde las primeras 24 h en comparación con los valores de C+. A 48 h no hay un aumento en la fluorescencia, pero es notable un incremento abrupto

en la cantidad de proteína, el cual equivale a un incremento del 72% del valor inicial para la concentración de 10 ng/mL (342 μ M a 24 h). A 72 h se observa que la fluorescencia presenta un aumento poco menor al de C+ con una diferencia del -17% respecto a este; además, la cantidad de proteína decrece aproximadamente 21% en comparación con el valor obtenido a 48 h, y tiene una diferencia de tan solo el -3% respecto al valor de proteína para C+ (481 μ M a 72h). Al comparar el comportamiento de proteína con los valores del ensayo de nitritos, representados en la figura 26, se observa que la concentración de 10 ng/mL presenta incrementos de ambas variables a 48 h, mientras que la comparación de las variables a 72 h no es significativa debido a la falta de datos que proporcionen mayor precisión de la lectura de nitritos para esta concentración de nanopartículas de PET.

4.2.5 Seguimiento por microscopía fluorescente

Posterior a la tinción de nanopartículas, se realizó el seguimiento de la interacción con las células mediante microscopía fluorescente, mediante la cual se logró recuperar micrografías de campo claro, fluorescencia verde y roja, que proporcionan más información sobre los componentes que aparecen en las micrografías. Se seleccionaron 9 zonas de la misma caja de Petri de 3 cm de diámetro, donde 25,000 células fueron expuestas a 10 μ L de nanopartículas de PET de concentración de 1 mg/mL teñidas. En este trabajo se discuten las micrografías recuperadas cada 24 h, a partir de las 0 h de exposición, en dos zonas en específico durante 2 días continuos y durante el quinto día. En las figuras 29 y 30 se observan las micrografías en campo claro con sus correspondientes micrografías en señal verde y roja para dos zonas de la caja de Petri. En ambas, la señal roja denota las partículas de PET teñidas con rojo Nilo, mientras que la señal verde se le atribuye al citoesqueleto de las células, dado que éstas están acopladas a GFP para la línea celular MDA-MB-231. Además, se destaca que las partículas de PET también fluorescen en la señal verde.

En estas dos figuras se aprecia la interacción de las células con las nanopartículas de PET desde el tiempo 0 de exposición, donde la figura 29A (así como las figuras 29E y 29I) demuestra que las células tienen la capacidad de engullir las nanopartículas de PET desde el inicio de su interacción, tal y como las células señaladas por un hexágono indican; al analizar la figura 29I se corrobora que las manchas negras visualizadas en la figura 29A en las células señaladas por un círculo corresponden a nanopartículas de PET dado que muestran fluorescencia roja, mientras que la figura 29E asegura que estas partículas se encuentran dentro de la célula ya que la fluorescencia verde, atribuida al citoesqueleto de las células MDA-MB-231, rodea dichas partículas. Si bien este comportamiento no se observa en la figura 30, se recalca que las micrografías de las figuras 29 y 30 corresponden a una misma muestra, pero en distintas zonas. A 24 h, principalmente en la figura 29, se observa un aumento de células redondeadas y se destaca la presencia de un cúmulo de partículas de 132 μ m de diámetro; si bien las células redondeadas que se observan a las 0 h se atribuyen a células que no pudieron adherirse a la caja de Petri durante la noche previa de incubación, a 24 h se atribuyen a un cambio morfológico dado que algunas de estas células redondeadas incluso tienen nanopartículas de PET en su interior, incluyendo agregados de gran tamaño.

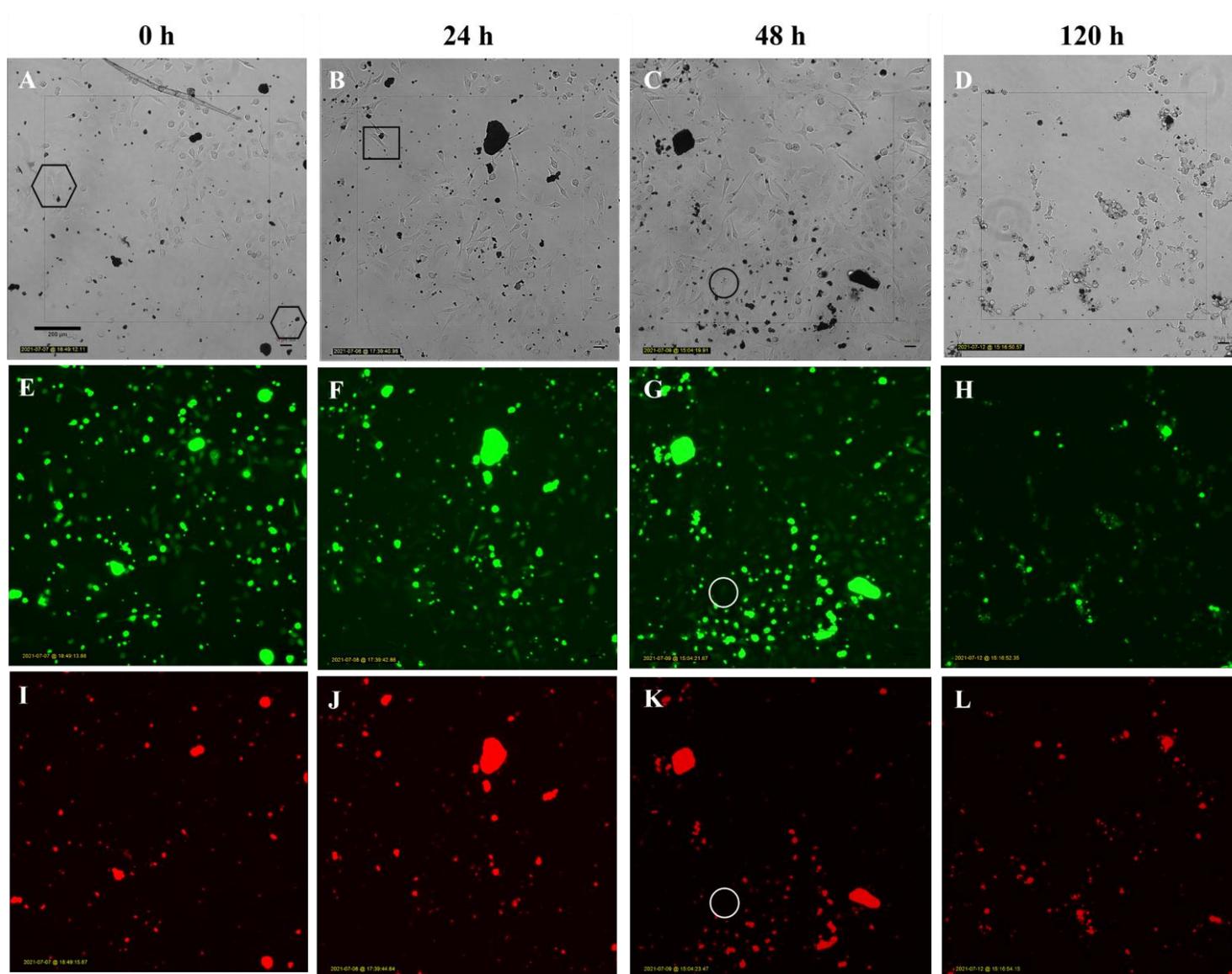


Figura 29. Micrografías obtenidas por microscopía fluorescente a 10x donde se exhiben los cambios morfológicos que las células MDA-MB-231 experimentan durante las primeras 48 h y hasta las 120 h de exposición a nanopartículas de PET de concentración de 1 mg/mL. Todas las imágenes presentan la escala mostrada en A. En rojo se denotan las nanopartículas de PET teñidas con rojo Nilo mientras que en verde se denota el citoesqueleto de las células MDA-MB-231. Los hexágonos que se aprecian en la figura A son indicativos para células que tienen nanopartículas de PET en su interior a partir de las 0 h de exposición. El recuadro señala una célula que parece estar fagocitando una partícula de PET y el círculo señala células con vesículas de gran tamaño en su interior, las cuales se señalan con blanco en sus respectivas micrografías fluorescentes. Asimismo, se observan grandes agregados de partículas de PET con un tamaño de hasta 132 μm .

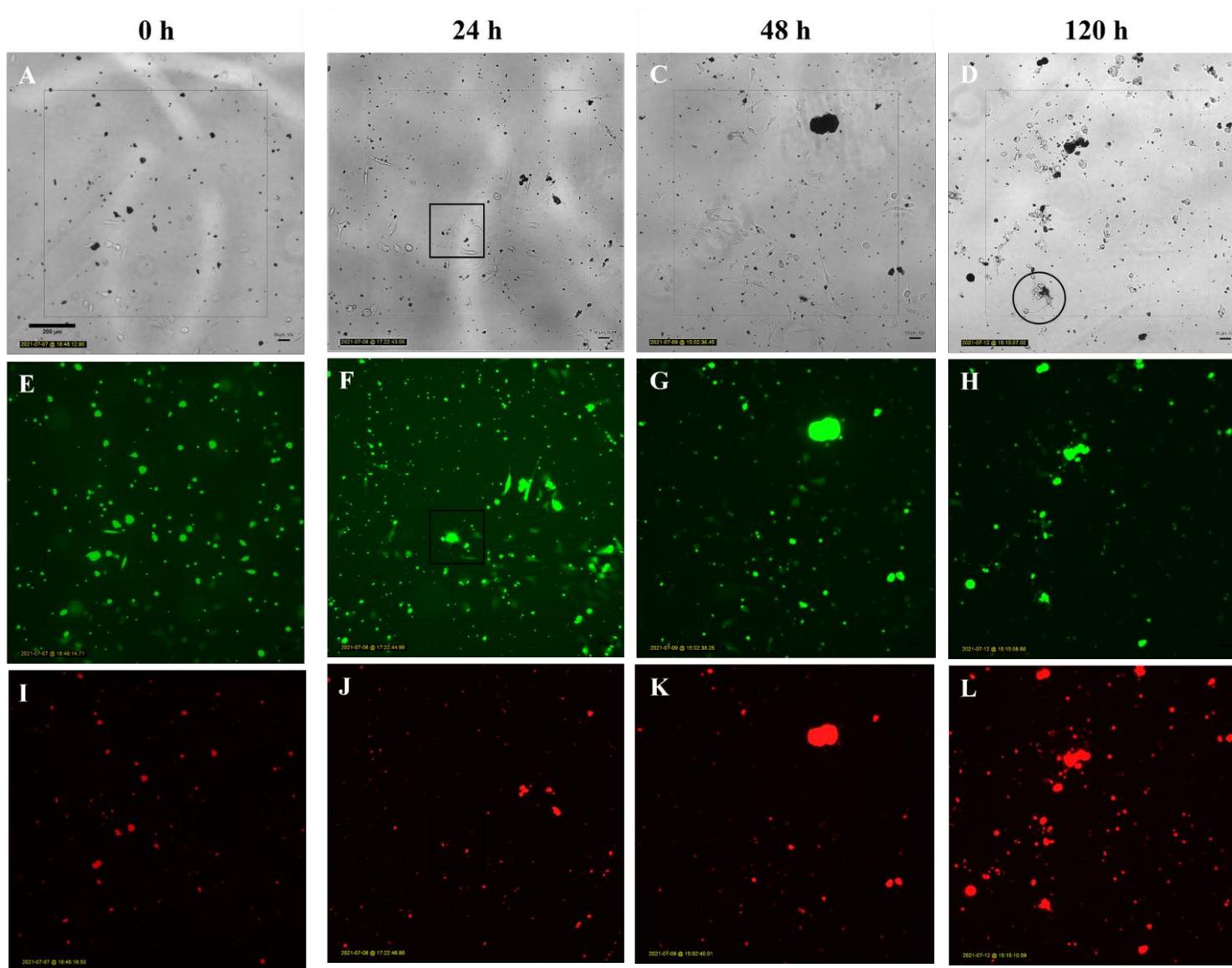


Figura 30. Ídem anterior. Los recuadros indican una célula con forma particular, la cual se presume que trata de engullir las partículas de PET que se encuentran a su alrededor y el círculo denota una célula con vesículas de gran tamaño. Las figuras 29 y 30 corresponden a la misma caja de Petri donde se llevó a cabo el seguimiento mediante microscopía fluorescente durante 5 días, siendo representativas de diferentes zonas cada una.

En ambas figuras, se observa que a 24 h hay mayor cantidad de células que han engullido nanopartículas de PET; particularmente la figura 29B (así como las figuras 29F y 29J) el recuadro parece demostrar cómo una célula está fagocitando una partícula de PET. Continuando con la figura 29, a 48 h se aprecia que las células tienen en su interior agregados de partículas de PET más grandes en comparación con aquellas engullidas a 0 h y 24 h; además, la célula señalada con el círculo exhibe una vesícula de gran tamaño en su interior, la cual, a diferencia con su entorno, no muestra la misma fluorescencia verde (como se observa en la figura 29G señalada con un círculo blanco) y que mediante la figura 29K se descarta que esta estructura sea una nanopartícula de PET dado que tampoco presenta fluorescencia roja. A 120 h se observa pérdida de la morfología en todas las células presentes en la micrografía, las cuales presentan agregados celulares la morfología varía y se puede observar que hay células circulares y otras que no tienen una forma en particular, ya sea que estén amorfas, o que presenten filopodios alargados que no presentan fluorescencia verde o cuya membrana no parece estar alterada como si las células estuvieran explotando. Este último fenómeno comienza a presentarse a partir de las 48 h, dado que la figura 29C en la parte inferior derecha también presenta este tipo de células agregadas

Respecto a la figura 30, a 24 h se observa una célula con forma peculiar en el centro de las micrografías en las figuras 30B, 30F y 30J, la cual está señalada con un recuadro; esta célula parece estar formando prolongaciones para poder fagocitar y engullir los agregados de nanopartículas de PET que se encuentran a su alrededor, tal y como las micrografías en señal verde y roja permiten discernir. A 48 h la proporción de células redondeadas también crece, y las células presentan en su interior agregados de partículas más grandes en comparación a las horas previas. Finalmente, a 120 horas nuevamente se observa que todas las células captadas en la micrografía tienen forma circular o amorfa, las cuales también presentan filopodios alargados; además, nuevamente se observa una célula con una vesícula de gran tamaño, señalada con un círculo en la figura 30D. Además, en la parte izquierda de esta micrografía, se observa una célula o un cúmulo de células con una morfología singular, donde las figuras 30H y 30L demuestran que hay partículas de PET (fluorescencia roja) dentro de su estructura, la cual aún presenta fluorescencia verde.

Por otro lado, para poder observar y seguir el comportamiento de las células en presencia de nanopartículas de PET, se realizó un ensayo en una caja de Petri de 3 cm de diámetro con 50,000 células y 100 μ L de nanopartículas de PET de concentración 1 mg/mL teñidas, se destaca que éstas únicamente se mantuvieron en incubación una noche sin las partículas y el seguimiento se llevó a cabo durante 4 horas manteniendo la temperatura a 37°C y sin atmósfera de CO₂. Se recuperaron aproximadamente 145 micrografías en señal de campo claro, fluorescencia verde y roja, con las cuales se realizaron videos para ver el dinamismo de las células. Las figuras 31 y 32 muestran las micrografías cuyo contenido exhibe de manera general el comportamiento que se suscita dentro de los primeros minutos y primeras horas de exposición de las células a las partículas de PET; al igual que el seguimiento anterior, estas dos figuras muestran micrografías que fueron recuperadas de la misma muestra, pero en diferentes zonas.

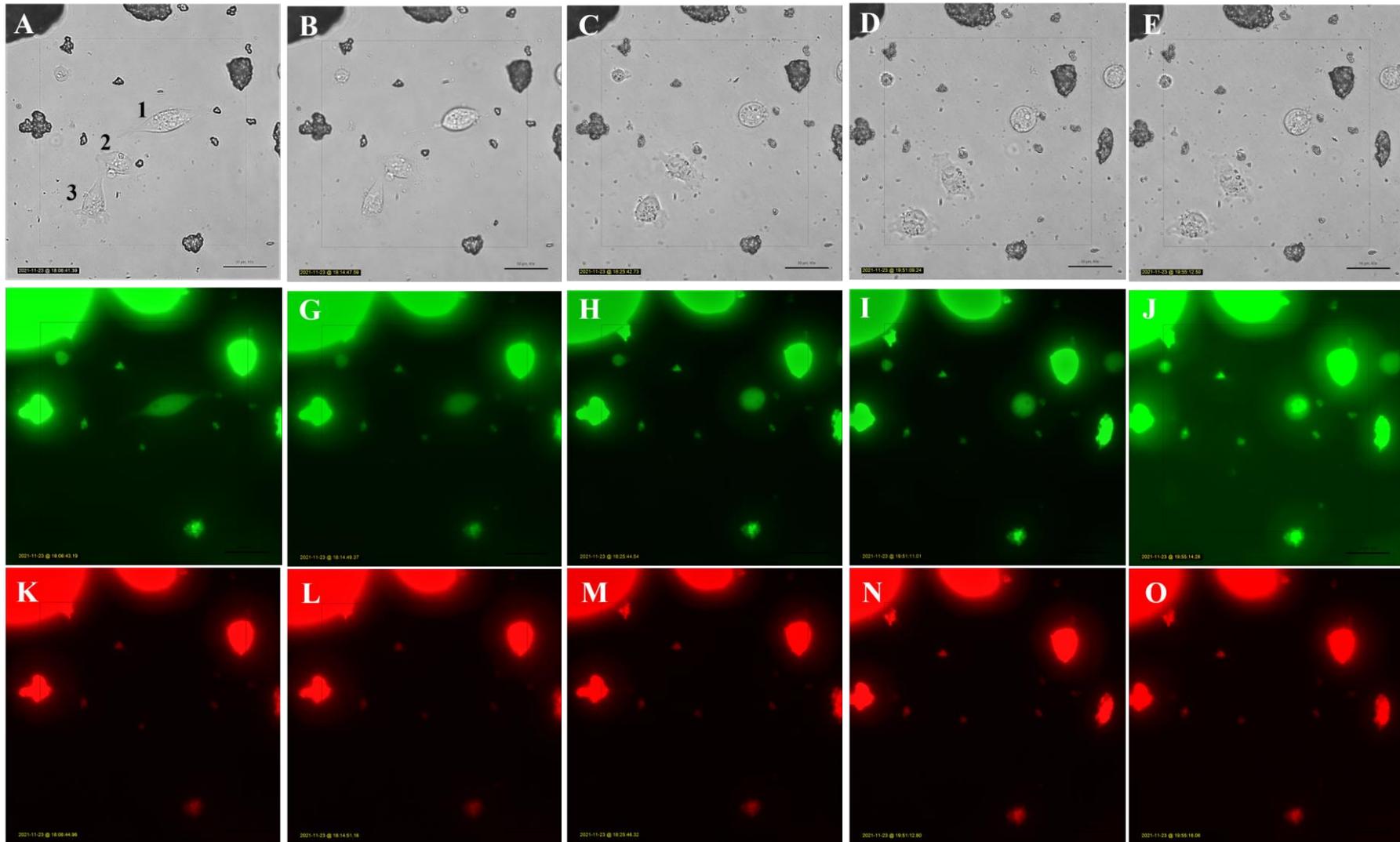


Figura 31. Micrografías obtenidas por microscopía fluorescente a 40x que representan el comportamiento de las células MDA-MB-231 expuestas a nanopartículas de PET teñidas con rojo Nilo. Las micrografías en señal verde denotan el citoesqueleto de las células, mientras que la señal roja se usó para rastrear a las nanopartículas de PET. Estas micrografías son representativas del comportamiento que se observó para esta zona de la muestra en hora y media de seguimiento, a 37°C y sin atmósfera de CO₂.

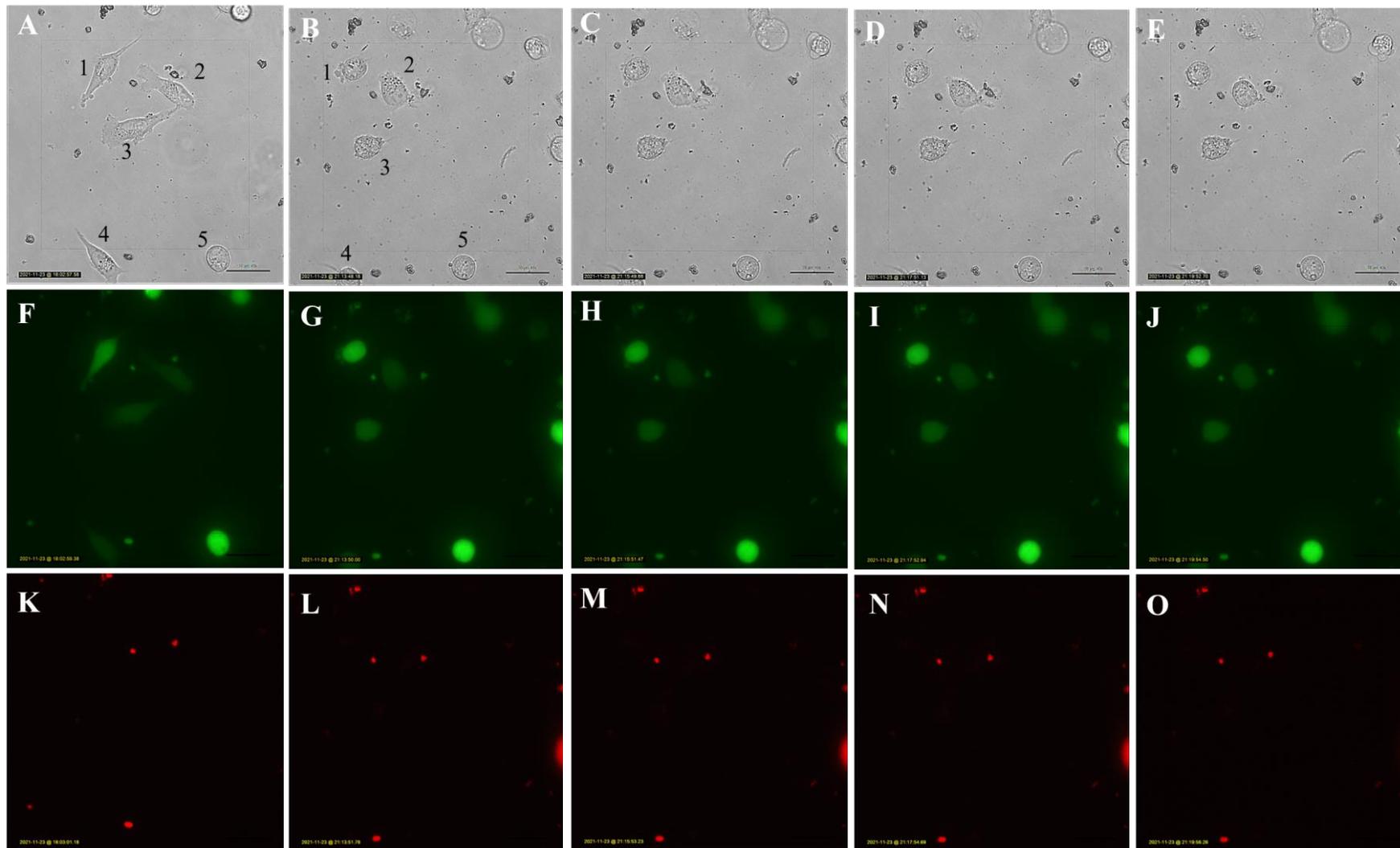


Figura 32. Ídem anterior. Se observa que la célula marcada con el #2 alarga prolongaciones de su membrana para engullir partículas de PET. Las figuras 31 y 32 corresponden a la misma caja de Petri donde se llevó a cabo el seguimiento por medio de microscopía fluorescente durante hora y media, siendo representativas de diferentes zonas cada una y donde las micrografías en señal verde y roja corresponden a las micrografías de señal blanca posicionadas en las partes superiores.

En la figura 31 se observan principalmente 3 células, las cuales están enumeradas para una mejor referencia y que en un inicio están adheridas a la superficie de la caja de Petri; a los 6 min de exposición (tiempo en el que se tomó la micrografía de la figura 31A) la célula marcada con el número 2 parece estar engullendo un agregado de partículas de PET, mientras que la célula de la parte superior, la célula #1, tiene una prolongación que parece tocar otro cúmulo de partículas de PET que se encuentra a su derecha. A los 12 minutos de exposición, en la figura 31B e inferiores, se observa que las partículas de PET que la célula #2 había engullido ahora están fuera de la membrana de dicha célula, además, la célula #1 se ha desplazado en la dirección de las partículas de PET; esta célula toma una forma circular, como se muestra en la figura 31C y posteriormente se acerca a las partículas de PET que tiene a la derecha, aunque después retrocede sin engullirlas como se muestra en las figuras 31D y 31E. Se destaca que este comportamiento donde las células se acercan a las partículas de PET y luego retroceden se vio al menos 4 veces en esta zona al realizar el seguimiento. Además, en esta zona se observan agregados de partículas de PET con un tamaño de hasta 36.53 μm de diámetro.

Por otra parte, la figura 32 muestra el comportamiento de 5 células, las cuales han sido también enumeradas. En la figura 32A se observan que las células están adheridas a excepción de la célula #5, la cual posiblemente no se adhirió en el tiempo de incubación. Esta micrografía, al igual que las de la figura 32F y 32K son representativas del tiempo 0 de exposición a las nanopartículas de PET. Las figuras 32B, 32G y 32L muestran las mismas células, pero con un desplazamiento por parte del punto de referencia, con un tiempo de exposición de 3 h y 11 min transcurridos; en dicho tiempo, las células perdieron su morfología y tomaron una forma circular, mientras que la célula #2 se desplazó hacia las partículas de PET que tiene en la parte superior. De igual manera, se observa en la parte inferior que la célula #5 tiene una partícula de PET adherida a su superficie, la cual se adhirió al pasar 1h y 19 min y que se retuvo en ese lugar hasta que finalizó el seguimiento. En las figuras 32C, 32H y 32M se observa que la célula #2 elonga unos pseudópodos que parecen tratar de fagocitar el aglomerado de partículas que tiene a la derecha. Estas elongaciones se hacen más pequeñas en las micrografías de la figura 32D e inferiores, donde la figura 32I expone de manera más clara la estructura de la célula en cuestión con la fluorescencia verde. Finalmente, se observa como estas prolongaciones se retraen sin engullir las partículas de PET.

4.2.6 Seguimiento de partículas de PET por microscopía confocal

Por último, se realizó la preparación de muestras para observar las células mediante microscopía confocal. En el proceso, se realizó nuevamente un seguimiento por microscopía fluorescente con las herramientas antes descritas. Era necesario exponer las células a las nanopartículas de PET, por lo que hacer un seguimiento más durante este proceso brinda mayor comprensión sobre los efectos relacionados a esta interacción. Así, en la figura 33 se observan las micrografías representativas de los efectos observados en el transcurso de 1 h.

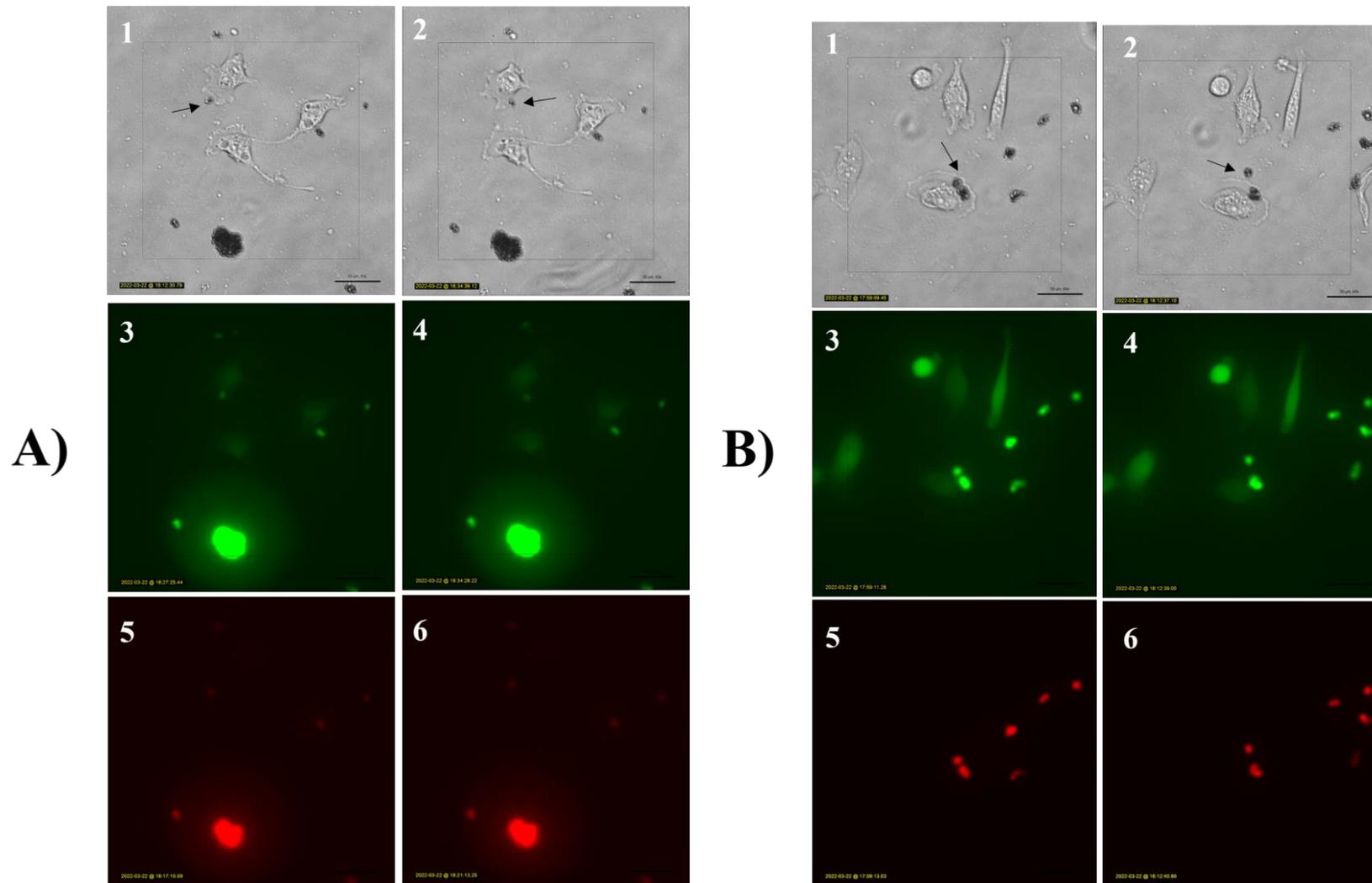


Figura 33. Micrografías obtenidas por microscopía fluorescente a 40x de células MDA-MB-231 expuestas a nanopartículas de PET teñidas con rojo Nilo en concentración de 10 mg/mL sobre un cubreobjetos funcionalizado con poli-L-lisina al 10% en PBS 1X. En verde se denota el citoesqueleto de las células, mientras que en rojo las nanopartículas de PET. Las micrografías de **A)** y **B)** son representativas del comportamiento de las células en dos zonas diferentes del mismo ensayo, al cual se le dio seguimiento durante 1 h a 37°C y con una atmósfera con 5% CO₂. Se recalca que las partículas de PET muestran fluorescencia tanto en señal verde como en roja.

En las micrografías de la figura 33A se observan 3 células con lo que parecen ser vesículas de gran tamaño (de 3.6 μm hasta 8.9 μm de diámetro) que tienen diferente intensidad o nula fluorescencia verde como se aprecia en la figura 33-A3 y 33-A4. Estas vesículas se observan desde el tiempo 0. La flecha en A señala a una célula que tiene partículas de PET en su interior y que posteriormente son expulsadas, mientras que en B, se señala a una que mantiene un cúmulo de partículas de PET adherido a su membrana celular, el cual permanece en la misma posición hasta la finalización del seguimiento. Por otra parte, en la figura 33B se observa cómo una célula tiene en su interior 2 cúmulos de partículas de PET de gran tamaño (aprox. 11 μm), de los cuales la célula expulsa uno y mantiene otro en su interior. Este último permanece dentro incluso en la última micrografía recuperada.

Para terminar, en las figuras 34, 35 y 36 se observan las micrografías recuperadas por medio de microscopía confocal. La muestra examinada es la misma que está siendo representada en la figura 33; de hecho, las células identificadas en dicha figura se intentaron localizar nuevamente, sin embargo, no se tuvo éxito.

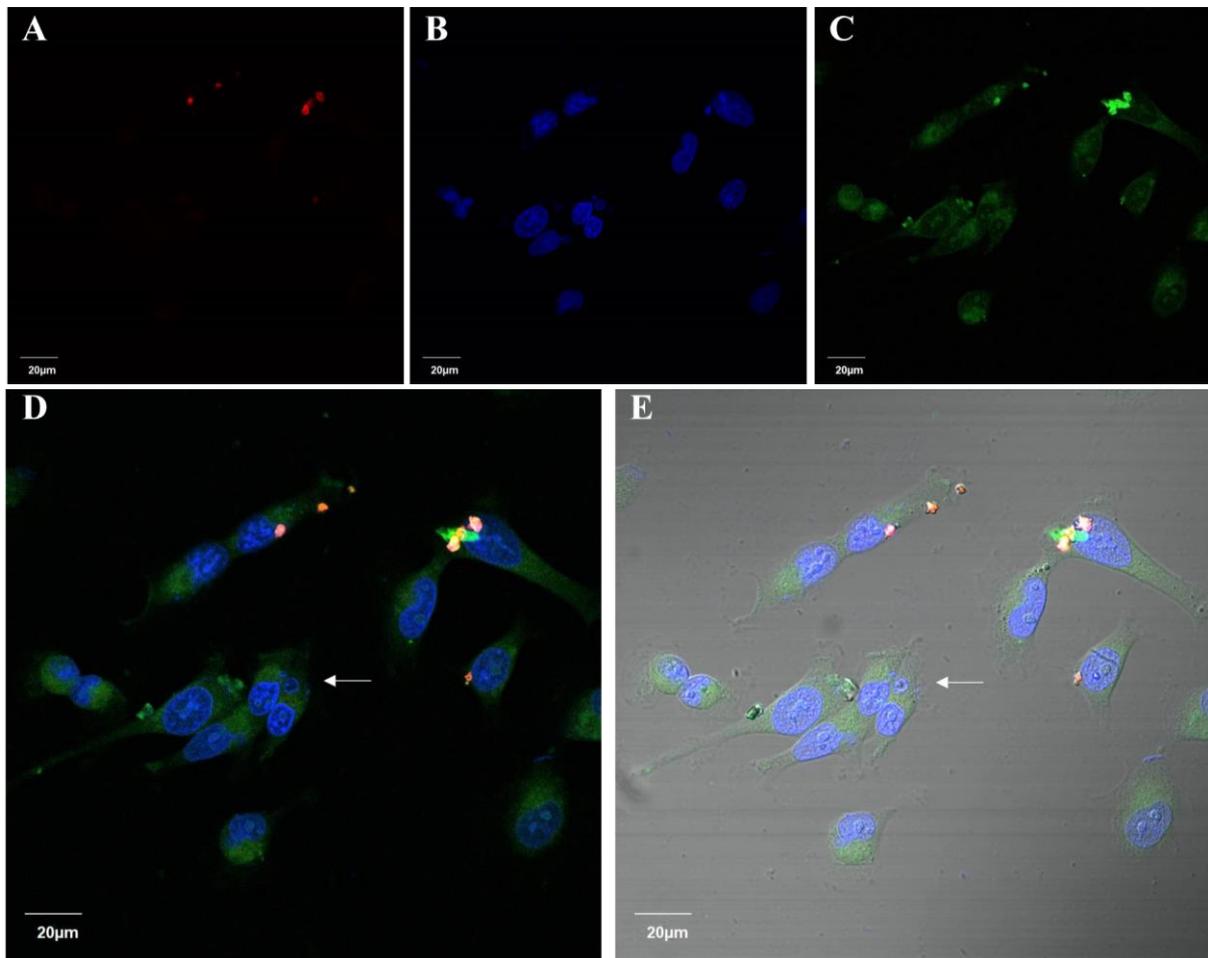


Figura 34. Micrografías obtenidas por microscopía confocal con magnificación de la lente objetivo a 60x que demuestra la presencia de micronúcleos en células MDA-MB-231 que interactuaron con nanopartículas de PET por 1 h. Se exhiben **A)** las nanopartículas de PET teñidas con rojo Nilo (rojo), **B)** núcleos celulares teñidos con DAPI (azul), **C)** citoesqueleto de las células correspondiente a GFP (verde), **D)** combinación de imágenes fluorescentes y **E)** combinación con campo claro.

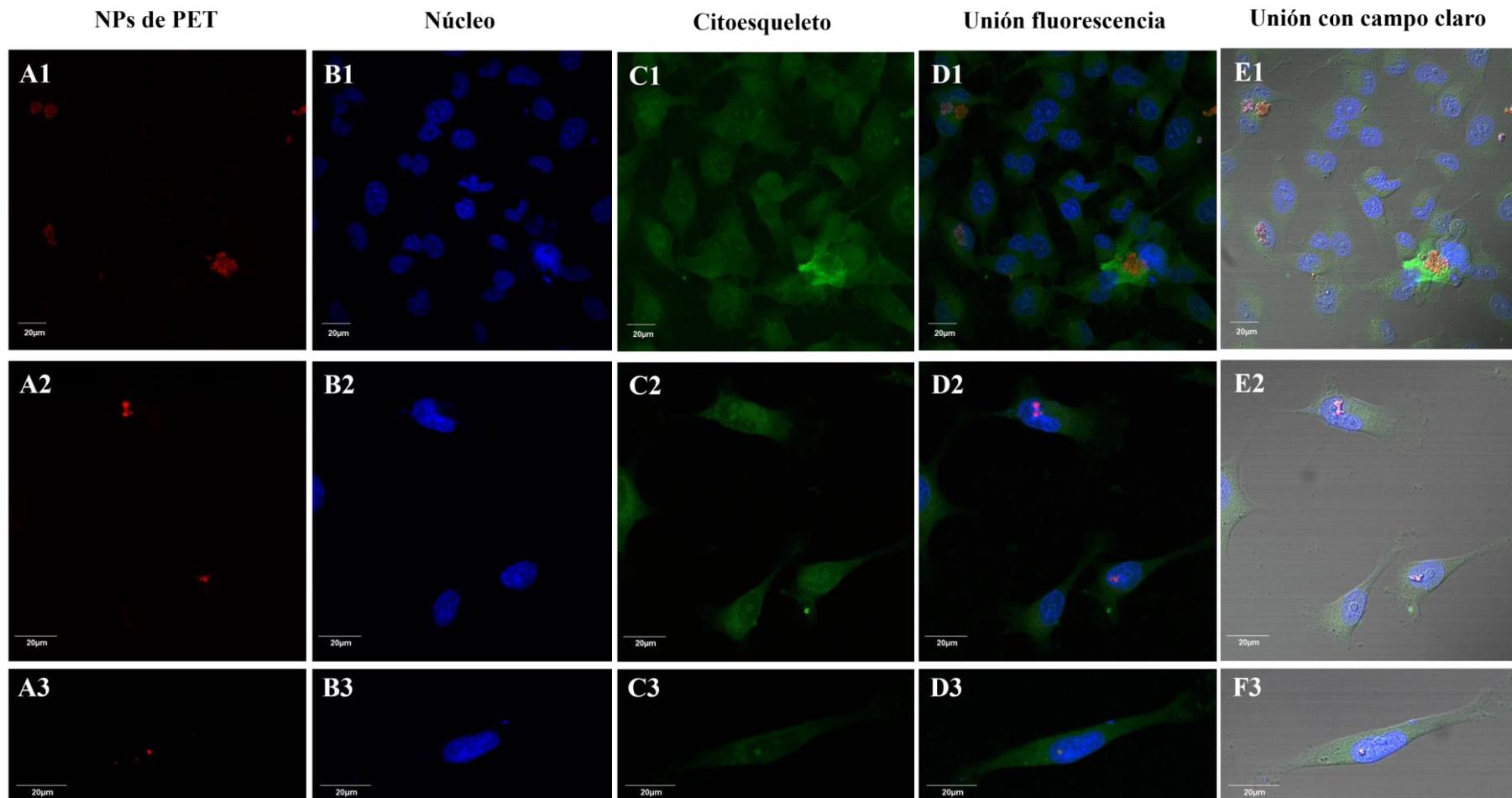


Figura 35. Micrografías obtenidas por microscopía confocal con magnificación de la lente objetivo a 60x que exhiben el resultado de la interacción de células MDA-MB-231 con nanopartículas de PET por 1 h. Se muestran **A**) las nanopartículas de PET teñidas con rojo Nilo (rojo), **B**) los núcleos celulares teñidos con DAPI (azul) y **C**) el citoesqueleto de las células en verde, correspondiente a la GFP acoplada a esta línea celular. De igual manera se muestran **D**) las combinaciones de imágenes fluorescentes y **E**) la combinación con campo claro. Cada fila representa una zona diferente de la misma muestra examinada.

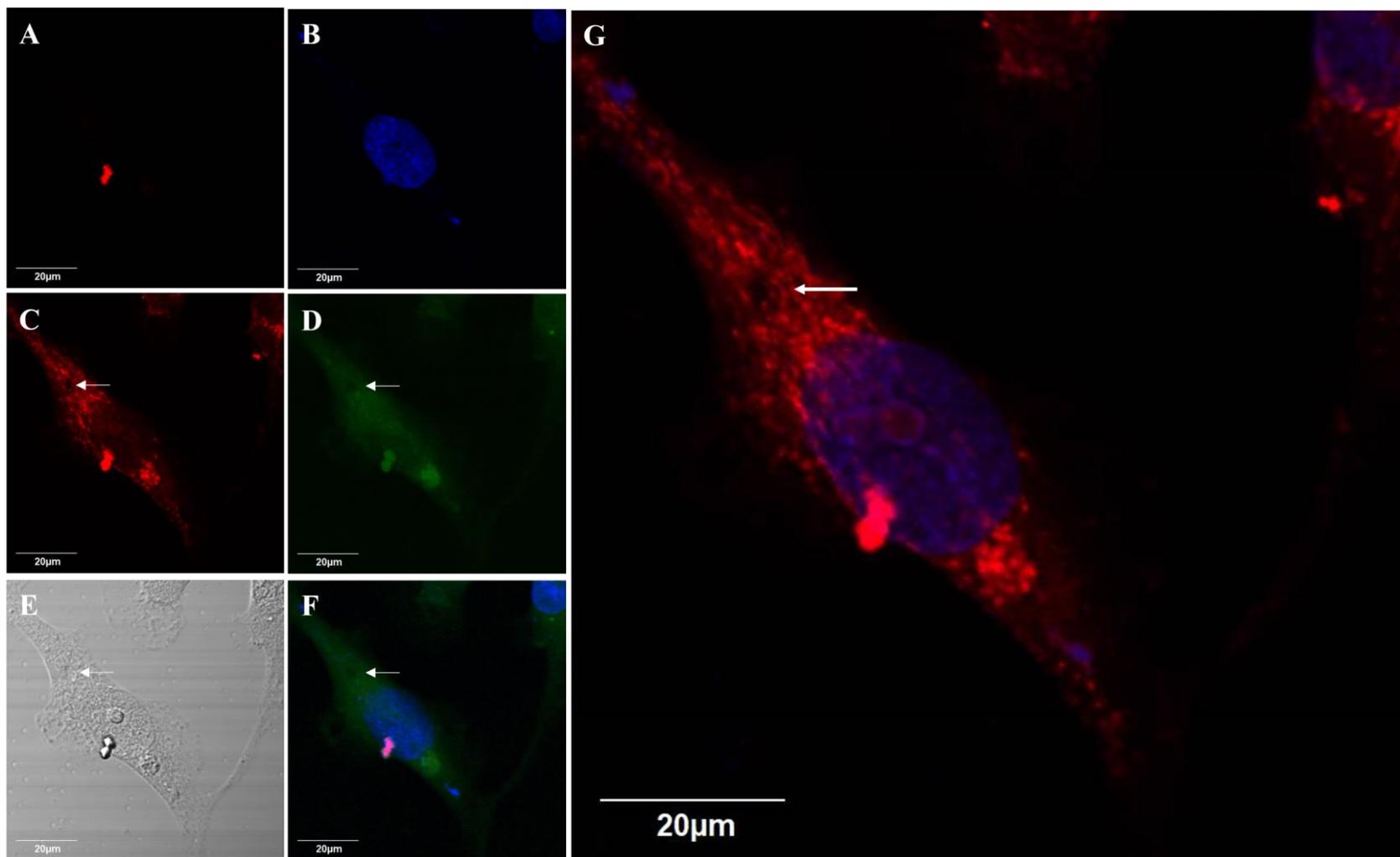


Figura 36. Micrografías obtenidas por microscopía confocal con magnificación de la lente objetivo a 60x que exhibe la internalización de nanopartículas de PET por células MDA-MB-231 después de su interacción durante 1 h. **A)** Nanopartículas de PET teñidas con rojo Nilo (rojo), **B)** núcleo celular teñido con DAPI (azul), **C)** cadherinas teñidas con anti-N-cadherina Alexa Fluor 546® (rojo), **D)** citoesqueleto en verde, atribuido a la GFP que expresa esta línea celular, **E)** micrografía en campo claro, así como combinación de imágenes fluorescentes **F)** núcleo, nanopartículas de PET y citoesqueleto y **G)** núcleo, nanopartículas de PET y cadherinas. Se señala con una flecha blanca una porción del cuerpo celular cuya membrana parece estar alterada debido a la falta de fluorescencia en dicha zona.

Las figuras anteriores corresponden a la misma muestra (así como la figura 33) en diferentes zonas. La figura 34, con aumento x1, muestra la presencia de micronúcleos en las células, los cuales son denotados mediante fluorescencia azul debido a su tinción con DAPI y señalados con una flecha blanca en las micrografías de señales combinadas. Se deduce que son micronúcleos debido a su forma, intensidad de fluorescencia y localización. Además, en estas micrografías se observan grandes partículas de PET en el citoplasma de algunas células, las cuales parecen estar dirigiéndose a los núcleos debido a su cercanía con estos.

La figura 35 exhibe 3 zonas; en estas se observa que, a 1 h de exposición, las nanopartículas de PET (teñidas con rojo Nilo) son internalizadas por las células. Al observar la escala de las micrografías y la combinación de imágenes (figura 35 columna D y E), se distinguen agregados de nanopartículas de PET de gran tamaño localizados en los núcleos celulares. De manera específica, las micrografías de la primera fila fueron tomadas con aumento x1.0 y muestra varias células interactuando con cúmulos de partículas de PET. Estos cúmulos se encuentran rodeando la membrana celular, al igual que dentro del citoplasma y del núcleo de algunas células en particular, lo cual indica que las células MDA-MB-231 pueden internalizar agregados grandes de partículas de PET en más de una ocasión dentro de la primera hora de exposición. El tamaño de los agregados, según la escala que se observa en las micrografías, es de hasta 9 μm aproximadamente. Las micrografías de la segunda fila fueron recuperadas con aumento x1.5 y las de la tercera con aumento x1.7; en éstas, se observa que las células tienen partículas de PET de más de 5.8 μm en el núcleo, mientras que las micrografías de la última fila muestran a una célula aislada con una partícula de PET de aprox. 3 μm de diámetro en su interior.

La figura 36 muestra micrografías tomadas con aumento x2.0 que enfocan una célula que muestra partículas de PET dentro del núcleo y en el citoplasma, donde el tamaño aproximado de estas partículas es de 3.5 a 4 μm de diámetro. Las figuras 36C y 36 G exhiben el comportamiento de las cadherinas, teñidas con anti-N-cadherina (Alexa 546 [®]) cuando las células han internalizado partículas de PET. Se observa una agrupación de cadherinas en la zona inferior de la célula, zona a la cual se le atribuye la formación de una vesícula por las características que se observan en las micrografías de fluorescencia verde y de campo claro (figura 36D y 36E correspondientemente). Las cadherinas se observan de manera definida y distribuida en el cuerpo de las células, en las zonas de la periferia y se concentran en la vesícula de la parte inferior. Asimismo, en estas imágenes se señala con una flecha blanca una zona circular en la parte superior de la célula donde no se encuentra fluorescencia de ninguna señal, lo cual podría indicar la ruptura de la membrana celular

Capítulo V: Marco analítico

Esta investigación ha permitido mostrar los posibles efectos citotóxicos asociados a la interacción de nanopartículas de PET con células humanas, usando como modelo *in vitro* la línea celular MDA-MB-231. Para ello, se usaron partículas de PET creadas a partir de la metodología descrita por Rodríguez Hernández y colaboradores (2019); los autores reportan la obtención de partículas con diferente morfología y con una distribución de tamaño de 50 a 300 nm, las cuales demostraron conservar las propiedades químicas y estructurales del PET mediante espectrometría por transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos X (XRD).

Se determinó la estabilidad de las nanopartículas de PET en diferentes soluciones mediante DLS, de esta manera, se busca tener comprensión sobre el efecto que los diferentes medios empleados en el cultivo celular tienen en la formación de coronas, ya que estas tienen un impacto en la absorción de partículas, en su internalización y liberación, así como en su tamaño y composición superficial (Stapleton, 2021; Voronovic et al., 2021). El potencial Z indica que las nanopartículas de PET obtenidas por este método presentan carga negativa. En agua destilada el tamaño de partícula promedio es de 1.99 μm , sin embargo, este tamaño se le atribuye a la formación de agregados debido al carácter hidrofóbico del PET (Suasnavas Flores, 2017), además, ningún otro medio muestra valores similares. El valor obtenido en este control (1.234×10^4 nm) se le atribuye a un error de lectura debido al límite de detección del equipo, el cual es de 1 nm (Malvern Panalytical, 2022), mientras que las moléculas del agua tienen un diámetro aproximado de 0.35 nm (Boyd, 2019)

En general, el tamaño de partícula en los controles de los medios presenta una distribución de tamaño amplia debido a su respectivo contenido (sales inorgánicas, glucosa, aminoácidos, vitaminas, iones, etc.); se encontró un aumento en la distribución de tamaño del 78.24% para el PBS 1X al agregar partículas de PET. Este aumento de tamaño tan dramático se debe al alto contenido de sales inorgánicas de este medio, cuyos elementos están unidos por medio de enlaces iónicos. De esta manera, los iones del entorno se agrupan en la superficie de las partículas e incrementan su diámetro hidrodinámico; el valor absoluto del potencial Z en el control es bajo, lo cual indica la inestabilidad del coloide, sin embargo, al agregar las nanopartículas de PET hay un aumento en el valor absoluto del potencial Z que, aunque se mantiene en valores indicados para coloides relativamente estables, el tamaño es muy grande (970.1 ± 139.4). En este caso, la alta concentración de metabolitos provoca que las fuerzas de Van der Waals involucradas en la adsorción de los iones a las nanopartículas sean importantes, pero éstas no son consideradas en la técnica de DLS, de tal manera que el valor del potencial Z no brinda un panorama adecuado (Bhattacharjee, 2016). Esta observación también aplica para el caso del potencial Z obtenido en el agua destilada, donde la hidrofobicidad del PET hace que las nanopartículas se aglomeren.

Particularmente, los tamaños presentados para el DMEM sin suplementar se atribuyen también a las moléculas de gran tamaño que tienen este medio (glucosa, vitaminas, aminoácidos, entre otros), las cuales se encuentran en hasta 4 veces mayor cantidad en

comparación a los medios MEM; el decremento de tamaño al agregar PET se debe a la interacción de las partículas de PET con dichas moléculas, las cuales se fragmentan y acortan a la vez una porción de su estructura migra y forma la corona en las partículas de PET. Esto concuerda con las observaciones planteadas por Ge y colaboradores (2015), quienes indican que las proteínas pueden desplegarse y exponer epítopos ocultos, así como formar nuevos, cuando forman coronas; es decir, pueden sufrir cambios estructurales y químicos al asociarse con la superficie de las partículas.

Los trabajos de Monti et al. (2015) y Magrì et al. (2018) señalan que la estabilidad coloidal de partículas de plástico se ve afectada por la presencia de proteínas séricas, donde Magrì y colaboradores, en particular, señalan que éstas mejoran la estabilidad de partículas de PET en el DMEM suplementado. De esta manera, las lecturas de tamaño del DMEM suplementado (el cual contiene suero fetal bovino), así como el de MEM solo y MEM suplementado describen de mejor manera el tamaño de las partículas de PET empleadas. Su tamaño se mantiene muy levemente por encima de los 100 nm en los tres casos, donde el potencial Z indica que las partículas son relativamente estables (Bhattacharjee, 2016).

Por último, los valores singulares de tamaño para el SFB (50%) se atribuye a dos situaciones; la primera es que este medio fue el último en medirse, por lo que la solución de nanopartículas de PET que se le agregó pudo haberse precipitado, de tal manera que los μL de la solución de PET que se le agregaron tendrían nula cantidad de estas partículas. El segundo caso es que, debido al alto contenido de proteínas de este medio y a su alta densidad, las partículas de PET se aglomeraron con las moléculas del medio y se sedimentaron, de tal forma que los valores de tamaño presentados son de las moléculas más pequeñas que lograron permanecer a manera de coloide en esta muestra. Los medios de principal uso en el cultivo celular fueron el DMEM y MEM suplementados, en los cuales los valores de tamaño de las partículas de PET no presentan diferencias significativas. De esta manera, el uso de alguno de estos dos medios no supone rutas de internalización o de absorción diferentes atribuibles al tamaño o a la conformación de coronas de diferente naturaleza.

Los datos de tamaño descritos, así como los tamaños de las partículas de PET que se observan en las micrografías presentadas, señalan la presencia de partículas pequeñas y de grandes agregados, cuyo tamaño incluso supera los 130 μm de diámetro. Respecto a ello, se observa que la formación de agregados se suscita principalmente al tener concentraciones altas de PET, tal como lo muestran las micrografías recuperadas para las concentraciones de 1 mg/mL, 100 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$. De esta manera se deduce que la cantidad de partículas de PET, el medio de su entorno y el tiempo en el que las partículas están suspendidas, son factores que propician la formación de agregados y de coronas. Se presume, que la corona influencia su captación e internalización celular (Monti et al., 2015), lo cual se ve reflejado en las diversas micrografías expuestas en este trabajo, donde, en efecto, se observan partículas de PET en el interior de las células MDA-MB-231. Si bien hay aglomerados de gran tamaño, el tamaño máximo de las partículas internalizadas en este trabajo es de 10 μm .

Dentro de las primeras 24 h de exposición se observa una gran cantidad de partículas de PET adheridas a la superficie de las células, lo cual puede ser el inicio de la internalización celular (Liu et al., 2021), ya que este proceso puede llevarse a cabo de manera pasiva mediante procesos de difusión como señala el trabajo de Geiser y colaboradores (2003), quienes indican que aquellas partículas que persisten en la superficie epitelial serán absorbidas por éstas. Las micrográficas obtenidas permitieron observar la presencia de lamelipodios, los cuales son importantes para el desplazamiento celular y en procesos endocíticos dependientes de filamentos de actina, tales como la macropinocitosis y fagocitosis (Megias et al., 2019). De esta manera, se observa lo mencionado en el trabajo de Wright & Kelly (2017), quienes refieren que las células epiteliales y endoteliales son capaces de captar partículas por medio de procesos endocíticos y fagocíticos.

Con este trabajo, se evidencia que las células MDA-MB-231 son capaces de internalizar las partículas de PET de manera inmediata, incluyendo la captación de varias partículas de manera simultánea y de agregados de gran tamaño, sobre todo cuando hay concentraciones altas tales como 1 mg/mL. Además, se demuestra que dicha internalización parece estar mediada por los microfilamentos del citoesqueleto, ya que es notorio la presencia de pseudópodos que se alargan en dirección de las partículas para engullirlas incluso tan solo 6 min después de su exposición. Estas observaciones también se han reportado en los trabajos de Liu et al. (2021), Monti et al. (2015) y Aguilar-Guzmán et al. (2022), quienes demuestran que la captación de microplásticos es un proceso mediado principalmente por microfilamentos, donde predomina la macropinocitosis.

A un corto tiempo de exposición, la estructura de la cadherina se muestra como una malla laxa distribuida en el cuerpo celular y de manera localizada en lo que parece ser la formación de una vesícula; así, se observa que, dentro de la primera hora de interacción, la estructura y capacidad de adhesión celular aún no se ha perdido a pesar de que las células tengan partículas de PET en su interior. En las diferentes micrográficas se observa que las partículas de PET se encuentran en el citoplasma y migran a las regiones perinucleares para finalmente establecerse en el núcleo. Estas características son atribuibles a la nueva identidad que les brinda la corona, la cual es susceptible a la degradación y desintegración con el paso del tiempo. Las células exhiben daños en la membrana celular y vesículas de gran tamaño desde las primeras 24 h de exposición, lo cual está relacionado a una respuesta por la internalización de microplásticos como también se ha observado en trabajos de Aguilar-Guzmán et al. (2022) y Magrì et al. (2018).

Los resultados obtenidos del ensayo de viabilidad indican que las células tienen una respuesta a corto y largo plazo cuando éstas interactúan con las partículas de PET. En las primeras 24 h de exposición se observa que la viabilidad y proliferación celular decrece respecto a los valores obtenidos en el control positivo para todas las concentraciones de partículas de PET examinadas debido a la rápida internalización de las partículas de PET. Este efecto adverso perdura para concentraciones altas como se demostró con la concentración de 1 mg/mL; así, se acentúa que la interacción prolongada y constante a concentraciones elevadas de microplásticos interfiere y deteriora las funciones celulares de manera continua. Esta

respuesta incluso puede deberse a la citotoxicidad provocada por bioacumulación, ya que es posible encontrar agregados de PET de gran tamaño dentro de las células cuando hay muchas partículas en su entorno.

A concentraciones más bajas, el efecto a largo plazo se manifiesta como un incremento en la viabilidad celular; esto podría interpretarse como una mejora donde las células logran su supervivencia y el mantenimiento de sus funciones, pero no es así. Primero, cabe destacar que se intentó contar las células de los ensayos de manera tradicional para asegurar que el aumento de fluorescencia en los ensayos de viabilidad estuviera relacionado con un aumento en la cantidad de células, sin embargo, no se tuvo éxito al retirarlas de los pozos debido a su propiedad adherente. Así, de manera preliminar se decidió observar el comportamiento en la cantidad de proteína, ya que ésta debe aumentar con el tiempo debido a la proliferación celular; los datos obtenidos confirmaron que los datos de viabilidad tienen una relación lineal con la cantidad de biomasa el control (ver figura 28). Sin embargo, al analizar la concentración mínima de afectación (10 ng/mL), se observó un aumento en la cantidad de proteína desde las primeras 24 h, la cual incrementó a 48 h y decreció rápidamente a 72 h sin tener relación directa con la cantidad de fluorescencia. Estos cambios abruptos pueden significar que las células están sufriendo hiperplasia, que es el aumento anormal de células acompañado en un aumento de volumen y de su capacidad funcional (ECR, 2022), lo cual explica el aumento en la cantidad de proteína y de resazurina metabolizada. Este proceso ocurre de manera fisiológica en las glándulas mamarias (American Cancer Society, 2019), sin embargo, en este caso se puede atribuir a un efecto provocado por la presencia de PET, ya que el decremento abrupto es señal de que las células “desaparecen” o mueren.

Por otro lado, al analizar los niveles de nitritos/nitros se observó que la relación entre la cantidad de nitritos fue lineal respecto al tiempo para los controles positivo y negativo, con la diferencia de que las células presentaron menor concentración de nitritos en el control negativo. En el caso de los valores altos obtenidos para el control positivo, se sabe que esta característica es intrínseca de la línea celular MDA-MB-231, ya que son células de adenocarcinoma de mama de grado III, donde (Ranganathan et al., 2015) refieren una relación directa entre la expresión de óxido nítrico por iNOS con la etapa del cáncer de mama; de esta manera, indican que entre mayor sea el grado de malignidad del carcinoma, se tendrá mayor nivel de expresión de iNOS. Dado que las células empleadas en este trabajo son de grado III, se tiene una producción basal alta de óxido nítrico que se convierte en nitritos y nitros de manera rápida debido a su inestabilidad y por su oxidación en el entorno biológico (Solís Reyes, 2004). Más aún, este aumento podría estar relacionado directamente a la línea celular ya que Jin y colaboradores (2015) indican que la expresión de iNOS se implica en la sensibilización de células cancerosas a la apoptosis. Por otra parte, en el control negativo, las células absorben rápidamente el DMSO agregado a estas muestras, lo cual provoca muerte celular; así, hay menos células y por ende las cantidades que se producen de nitritos son mucho menores en comparación con el control positivo. No obstante, a pesar de la pérdida en la viabilidad celular, el aumento en la concentración de nitritos respecto al tiempo se debe a la sobreestimulación de iNOS.

Las células expuestas a partículas de PET muestran valores semejantes a los del control negativo y a largo plazo (72 h) se observa que todas exhiben valores bajos con diferencia significativa respecto al control positivo. Las células expuestas a concentraciones bajas (de 1 μg a 10 ng) siguen una relación lineal al aumentar la concentración de nitritos respecto al tiempo y manteniendo valores bajos. La tendencia de aumento respecto al tiempo, al igual que en el control negativo, se debe a la sobreestimulación de iNOS que se ve reflejado desde las 24 h y principalmente a las 48 h; estos periodos son importantes debido a que Cerqueira & Yoshida (2002) mencionan que después de su inducción, la iNOS está activa hasta por 20 h. A 72 h esta sobre estimulación cesa, por lo que la cantidad de nitritos no muestra incrementos abruptos.

Por otra parte, para concentraciones altas (1 mg/mL) se tiene un enorme incremento en la cantidad de nitritos a 48 h, el cual incluso supera a los valores del control, seguido por un decremento a 72 h. Esta respuesta se le atribuye a la sobreestimulación inmediata de iNOS, que produce óxido nítrico en grandes cantidades y el decremento que se observa a 72 h está relacionado con la interacción de estas especies con el medio, lo cual posteriormente provoca una respuesta citostática que demora e incluso detiene el crecimiento de las células (Cerqueira & Yoshida, 2002); este argumento se respalda en el decremento que presenta el porcentaje de viabilidad después de las 72 h para dicha concentración. Para concentraciones medias (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se observó un ligero decremento en la concentración de nitritos a 48 h, aunque la viabilidad aumento en ambos casos; el decremento en la cantidad de nitritos también supone un efecto citostático; dado que la cantidad de óxido nítrico fue menor que en la concentración de 1 mg/mL el decremento en la viabilidad no es pronunciado. Estas observaciones se podrían corroborar al observar el comportamiento de los nitritos por un periodo más largo, tal como 7 días, para comparar su variación respecto al tiempo y con la viabilidad celular.

Para determinar la influencia de las partículas de PET en la absorción de sustancias, se empleó un modelo de nitroprusiato de sodio. En las primeras 24 h es notable la disminución abrupta en la absorbancia de este compuesto cuando está expuesto a una alta concentración de partículas de PET (1 mg/mL); este valor se mantiene hasta finalizar el experimento con una variación pequeña atribuible a errores de manipulación y de lectura, ya que al mantener la misma muestra por 7 días el volumen se evaporó y disminuyó. La absorbancia del compuesto es directamente proporcional a su concentración (Díaz et al., 2006), por lo que la disminución representa la pérdida del compuesto en la muestra; de esta forma, se denota que el nitroprusiato de sodio ha sido absorbido por las partículas de PET, las cuales llegan a un punto de saturación.

No obstante, puede que las partículas de PET se hayan precipitado a lo largo del experimento ya que no se resuspendió al momento de realizar las lecturas, además, si bien las lecturas indican absorbancia del compuesto por el PET, este experimento se realizó utilizando PBS, por lo que los iones del medio forman una corona que incrementa el tamaño de las partículas y les brinda diferentes propiedades como se ha discutido anteriormente. Así, el resultado de este ensayo no aporta información veraz sobre la interacción del PET y el compuesto, ya que los iones afectan la medida e interfieren debido a la interacción que tienen con la superficie de las partículas. Esta observación sirve para redireccionar protocolos futuros

y prever este comportamiento. De igual manera, para reconducir la evaluación sobre las especies reactivas de nitrógeno, se recomienda evaluar la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), analizar la presencia de citoquinas relacionadas a la producción de óxido nítrico y realizar pruebas de apoptosis para complementar los resultados de viabilidad y proteína.

Otra característica que puede indicar alteraciones en la célula está relacionada con el núcleo celular. El trabajo de Garáte Carrillo (2016) indica que la presencia de múltiples nucleolos, así como núcleos grandes y poco cuerpo celular es característico de la línea MDA-MB-231. Sin embargo, también se observaron micronúcleos. Esto podría ser resultado del efecto citotóxico del óxido nítrico, ya que, al reaccionar con especies de oxígeno, éste se transforma en peroxinitrito, el cual puede oxidar y nitrar el ADN y provocar estas alteraciones (Aparicio Carrillo, 2017). En este trabajo de tesis se observó una pérdida de la morfología celular, que fue evidente y pronunciada después de 48 h de exposición a las partículas de PET. El cambio hacia una forma esférica y voluminosa ocurre por el desacoplamiento del citoesqueleto en la membrana celular y es indicio de muerte celular por apoptosis (Fackler & Grosse, 2008). También se observan filopodios que permanecen hasta las 120 h de exposición, siendo indicio de que la célula sigue sensando su entorno para poder sobrevivir. No obstante, las células no son capaces de digerir las partículas de PET o de generar una respuesta adecuada para su eliminación, ya que éstas son expulsadas de las células, incluso tras algún intento sin éxito por engullir a las partículas, las células optan por retraerse y alejarse de éstas. De esta manera, se constata que la concentración de PET en el entorno y el tiempo de exposición tienen un efecto adverso en las células que afecta la distribución de actina y las estructuras de microtúbulos, lo cual podría explicar la falta de fluorescencia, cambios morfológicos y daños encontrados en la membrana.

Como última observación, la presencia de vesículas citoplasmáticas perinucleares de gran tamaño y la disminución en la viabilidad celular son características de un tipo de muerte celular denominado paraptosis (Hager et al., 2018). Más aún, el trabajo de Pierroz y colaboradores (2016) manifiesta que es posible que se desarrolle una respuesta paraptótica cuando la diana es el núcleo, lo cual sucede con la localización de las partículas de PET, como se ha observado en las diferentes micrografías. Otras características de la paraptosis son aumento de volumen mitocondrial y la interrupción de la homeostasis del retículo endoplásmico, que desencadena la malformación de proteínas como respuesta (Hager et al., 2018; Pierroz et al., 2016; Medrán, 2007). Así, el aumento de proteína podría estar relacionado con un fallo en el retículo endoplásmico, a raíz de la paraptosis; para confirmar esta observación podría analizarse a mayor detalle el comportamiento de este organelo, así como el de la mitocondria e incluso la cantidad de caspasas que se ven involucradas en la activación de muerte celular.

Capítulo VI: Conclusiones

El PET contribuye a la contaminación por plástico en gran medida, ya que es uno de los materiales predilectos para la elaboración de empaques y otros objetos. El desperdicio de este material, así como su mala disposición, contribuye en gran medida a la contaminación por plásticos a la que hoy en día el mundo se enfrenta. A pesar de ser sometido a diversos agentes degradantes, los plásticos perduran y se fragmentan en pedazos pequeños denominados microplásticos. Diversos estudios confirman la presencia de estas partículas en el aire, agua y suelo, los cuales son incluso transferidos por medio de la cadena alimenticia hasta los humanos. El conocimiento sobre las características de los microplásticos, así como las consecuencias que estos tienen en los seres vivos y ecosistemas aún es escaso. Con el fin de contribuir a este campo de investigación, en este trabajo se evaluó la internalización de partículas de PET sintetizadas en laboratorio a partir de la metodología descrita por Rodríguez Hernández y colaboradores (2019) en la línea celular MDA-MB-231, con el fin de identificar los potenciales efectos adversos asociados a la interacción de las células con estas partículas. Se analizaron concentraciones que van de 10 ng/mL a 1 mg/mL, para corroborar la influencia de la concentración en los efectos. El análisis de los resultados obtenidos condujo a las siguientes conclusiones:

1. Se demostró que la concentración de partículas de PET, el medio circundante y el tiempo en suspensión son factores que propician la formación de corona y de agregados de gran tamaño.
2. Se confirma que las coronas brindan una nueva identidad a las partículas de PET, lo cual influencia su captación e internalización celular y les permite establecerse en el citoplasma, regiones perinucleares y en el núcleo.
3. Se evidencia que las células MDA-MB-231 son capaces de internalizar las partículas de PET de manera inmediata y simultánea, al igual que agregados cuando hay concentraciones altas (1 mg/mL). El tiempo mínimo de internalización en este trabajo fue de 6 min y el tamaño máximo de las partículas internalizadas fue de 10 μm .
4. La presencia y actividad de pseudópodos indica que la internalización de partículas de PET es dependiente y mediada por los microfilamentos del citoesqueleto, de tal forma que los procesos endocíticos involucrados son la macropinocitosis y fagocitosis.
5. La interacción prolongada y constante a concentraciones elevadas de partículas de PET, tales como 1 mg/mL, interfiere y deteriora las funciones celulares de manera continua, lo cual se refleja como un decremento de la viabilidad y proliferación celular a corto y largo plazo.

6. En concentraciones medias y bajas de partículas de PET (100 $\mu\text{g/mL}$ a 10 ng/mL) se presenta hiperplasia, lo cual está relacionado con un aumento anormal de células e incremento en su capacidad funcional, lo cual concuerda con los resultados obtenidos sobre grandes cantidades de proteína y de resazurina metabolizada para las muestras mencionadas.
7. Las partículas de PET alteran la distribución de actina y la estructura de microtúbulos, lo cual posteriormente da paso a la muerte celular ya que se observan daños en la membrana celular, cambio hacia una morfología circular y pérdida en la fluorescencia de las células a partir de 48 h de exposición
8. Los daños que presentan las células son atribuibles a una respuesta paraptótica, ya que se presenta disminución en la viabilidad celular, vesículas citoplasmáticas perinucleares de gran tamaño y una alta concentración de proteínas, la cual puede ser atribuible a fallos en el retículo endoplásmico y alojamiento de las partículas en el núcleo celular. Para confirmar esta observación y concluir que el tipo de muerte celular es paraptosis es necesario analizar otras de sus características, las cuales incluyen aumento de volumen mitocondrial, funcionamiento del retículo endoplásmico y activación de caspasas.
9. La interacción de las células MDA-MB-231 con las nanopartículas de PET provoca la sobreestimulación de la iNOS en las primeras 24 a 48 h de exposición, seguido de una respuesta citostática que demora o detiene el crecimiento de las células en mayor medida cuando hay partículas de PET en concentraciones altas (1 mg/mL), además de provocar una respuesta citotóxica que altera el ADN que da paso a la formación de micronúcleos.

Referencias

- Abbasi, S., & Turner, A. (2020). Human exposure to microplastics: A study in Iran. *J. Hazard. Mater.* 123799. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123799
- abcam. (2020). Griess reagent (ab234044). abcam. Consultado el 21 de Junio 2022, desde: https://www.abcam.com/griess-reagent-ab234044.html?gclid=CjwKCAjwCVCVBhA0EiwAT1fY79ogsGVJLZgtqLCFb0aP83VJdNviIqHupphL89U--AkCJvnjn0qEpRoC4KoQAvD_BwE
- ABC Natural. (2018). La angustiada imagen de un lobo con la cabeza atrapada en un recipiente de plástico. Consultado el 5 de Mayo 2022, desde: https://www.abc.es/natural/abci-angustiosa-imagen-lobo-cabeza-atrapada-recipiente-plastico-201807291631_noticia.html?ref=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F
- Afrin, S., Rahman, M., Hossain, N., Uddin, K., & Malafaia, G. (2022). Are there plastic particles in my sugar? A pioneering study on the characterization of microplastics in commercial sugars and risk assessment. *Sci. Env.* 837. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155849>.
- Aguilar-Guzmán, J. C., Bejtka, K., Fontana, M., Valsami-Jones, E., Meza Villezcas, A., Vazquez-Duhalt, R., & Rodríguez-Hernández, A. G. (2022). Polyethylene terephthalate nanoparticles effect on RAW 264.7 macrophage cells. *Micropl. & Nanopl.* 2(9). <https://doi.org/10.1186/s43591-022-00027-1>
- Al Naggar, Y., Brinkmann, M., Sayes, C. M., AL-Kahtani, S. N., Dar, S. A., El-Seedi, H. R., Grünwald, B., & Giesy, J. P. (2021). Are Honey Bees at Risk from Microplastics? *Toxics.* 9(5). doi:10.3390/toxics9050109
- American Cancer Society. (2019). Hiperplasia del seno (ductal o lobulillar). American Cancer Society. Consultado el 15 de Julio 2022, desde: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/afecciones-no-cancerosas-de-los-senos/hiperplasia-del-seno-ductal-o-lobulillar.html#referencias>
- Aparicio Carrillo, O. E. (2017). Papel del Óxido Nítrico (NO) y de Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS) sobre el potencial metastásico de células tumorales de mama, MDA-MB-231. [Tesis

para obtener el grado de Maestría en Ciencias Fisiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]

Arapack. (2018) ¿Qué es el PET? Arapack. Consultado el 12 de Mayo 2022, desde:

<https://www.arapack.com/faq/que-es-el-pet/>

ATCC. (2019). Technical Data Sheet: MDA-MB-231 VIM RFP. ATCC. Consultado el 16 de Mayo 2022, desde:

<https://www.atcc.org/~media/5BE9EAC345DC478F83F47FE0F6DA28CC.ashx>

Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J. Control. Release.* 235, 337-351. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>

Bhuyan, S. (2022). Effects of Microplastics on Fish and in Human Health. *Front. Environ. Sci.* 10(827289). doi: 10.3389/fenvs.2022.827289

Boyd, C. E. (2019, Julio 22). Tamaños de sustancias disueltas o suspendidas en el agua - Responsible Seafood Advocate. Global Seafood Alliance. Consultado el 1 de Septiembre 2022, desde:

<https://www.globalseafood.org/advocate/tamanos-de-sustancias-disueltas-o-suspendidas-en-el-agua/>

Burkhardt-Holm, P., & N'Guyen, A. (2019). Ingestion of microplastics by fish and other prey organisms of cetaceans, exemplified for two large baleen whale species. *Mar. Pollut. Bull.* 144, 224-234. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2019.04.068.

Buteler, M. (2019). ¿Qué es la contaminación por plástico y por qué nos afecta a todos? 16 (28). Revista Desde la Patagonia Difundiendo Saberes. ISSN: 2618-5385.

Cerqueira, N. F., & Yoshida, W. B. (2002). Óxido Nôtrico. Revisão. *Acta Cir. Bras.* 17(6), 417-423.

Chamorro, P. (2021). La ingesta de plástico fue registrada en más de 1.500 especies. National Geographic. Consultado el 5 de Mayo 2022, desde:

<https://www.nationalgeographicla.com/medio-ambiente/2021/08/la-ingesta-de-plastico-fue-registrada-en-mas-de-1500-especies>

Cienciasfera. (2012). 3.1 Reacciones de polimerización. Polímeros. Consultado el 17 de Febrero 2022, desde:

http://www.cienciasfera.com/materiales/fisicayquimica/quimica/tema18/31_reacciones_de_polimerizacin.html

Cobos, R. R. (2016). El polietileno tereftalato (PET) como envase de aguas minerales. *Bol. Soc. Esp. Hidrol. Méd.* 31(2), 179-190. DOI: 10.23853/bsehm.2017.0212

Colón, I., Caro, D., Bourdony, C. J., & Rosario, O. (2000). Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ. Health Perspect.* 108, 895–900. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108895>.

CONMEXICO. (2020). 1r Informe del acuerdo Nacional para la nueva economía del plástico en México.

CONMEXICO. (2021). 2o Informe del acuerdo Nacional para la nueva economía del plástico en México.

Connell, T. (2021). The Truth About Plastic Needs to Be Heard. *Plastics Magazine.* 6-7.

Cox, K. D., Covernton, G. A., Davies, H. L., Dower, J. F., & Dudas, S. E. (2019). Human Consumption of Microplastics. *Environ. Sci. Technol.* 2019(53), 7068–7074. DOI: 10.1021/acs.est.9b01517

Crawford, C. B., & Quinn, B. (2017). Microplastic Pollutants. *Elsevier Sci.* ISBN: 978-0-12-809406-8

Cristán Frías, A., Ize Lema, I., & Gavilán García, A. (2003). La situación de los envases de plástico en México. *Gaceta Ecológica*, (69), 67-82.

Cuadros-Moreno, A., Pimentel, R. C., Martínez, E. S.M., & Fernandez, J. Y. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación del tamaño de nanopartículas poliméricas. *LAJPE.* 8(4).

Cuéllar Mata, P., Solís Martínez, M. O., Sánchez Leyva, M. C., García Nieto, R. M., & Arias Negrete, S. (2010). El óxido nítrico: una molécula biológica llena de contrastes. *Acta Univ.* 20(3), 24-33. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41618860003>

Danopoulos, E., Jenner, L., Twiddy, M., & Rotchell, J. M. (2020). Microplastic contamination of salt intended for human consumption: a systematic review and meta-analysis. *SN Appl. Sci.*, 2(1950). <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03749-0>

Díaz, N. A., Bárcena Ruíz, J. A., Fernández Reyes, E., Galván Cejudo, A., Jorrín Novo, J., Peinado Peinado, J., Meléndez Valdés, F. T., & Túnez Fiñana, I. (2006). 8. Espectrofotetría:

- Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Consultado el 15 de Septiembre 2022, desde: https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf
- Díaz-Acosta, E. M. (2018). Nanopartículas de plata: síntesis y funcionalización. Una breve revisión. *Mundo Nano*, 12(22), 89-99. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2019.22.60758>
- Díaz Díaz, R. M., Mejía Medrano, S. J., Huerta de Mora, O. J., & Huerta Acha, E. A. (2009). Óxido Nítrico: la diversidad de sus efectos sistémicos. *Revista Científica Ciencia Médica*, 12(1), 35-38.
- ECR. (2022). Hiperplasia. Repositorio ECR. Consultado el 4 de Julio 2022, desde: <https://repositorio.ecr.edu.co/reda/OVAS/rehabilitacion/fisiopatologia/hiperplasia.html>
- Elíes Gómez, J. (2009). Efectos de los isómeros del resveratrol sobre la homeostasis del calcio y del óxido nítrico en células vasculares. [Trabajo para el grado de Doctor en Farmacia].
- 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). doi: 10.1371/journal.pone.0111913
- Fackler, O. T., & Grosse, R. (2008). Cell motility through plasma membrane blebbing. *J. Cell Biol.* 181(6). doi:10.1083/jcb.200802081
- Fundación Heinrich Böll. (2019). Plastic Atlas 2019: Facts and Figures about the World of Synthetic Polymers (2 ed.). Movimiento Break Free From Plastic. ISBN 978-3-86928-211-4
- Fundación Heinrich Böll. (2020). Plastic Atlas 2020: Facts and Figures about the World of Synthetic Polymers (1 ed.). Movimiento Break Free From Plastic.
- Garáte Carrillo, E. (2016). Ingeniería de células cancerosas de mama para la sobreproducción de la proteína Smad7, un inhibidor del TGF-beta. [Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)].
- García, S. (2009). Referencias históricas y evolución de los plásticos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 10(1), 71-80.

- Ge, C., Tian, J., Zhao, Y., Chen, C., Zhou, R., & Chai, Z. (2015). Towards understanding of nanoparticle–protein corona. *Arch. Toxicol.* 89(4), 519–539. doi:10.1007/s00204-015-1458-0
- Geiser, M., Schürch, S., & Gehr, P. (2003). Influence of surface chemistry and topography of particles on their immersion into the lung's surface-lining layer. *J. Appl. Physiol.* 94, 1793–1801. doi: 10.1152/jappphysiol.00514.2002
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* 3(7). DOI: 10.1126/sciadv.1700782
- Gómez Serrato, J. G. (2016). Diagnóstico del impacto del plástico - botellas sobre el medio ambiente: un estado del arte. [Trabajo de grado para obtener el título como Administrador Ambiental y de los Recursos Naturales, Universidad Santo Tomás].
- Góngora Pérez, J. P. (2014). La industria del plástico en México y el mundo. *Comercio Exterior*, 64(5), 8-9.
- González Cifuentes, M. A., & Reyes Carrillo, J. L. (2010). La biotecnología como medio para prevenir la contaminación ambiental con el uso de plásticos biodegradables. No. Monografía Laguna TD794.5 G66 2010.
- Greenpeace México. (2019). No todo el plástico se recicla. ¿Sabes por qué? Greenpeace. Consultado el 19 de Marzo 19 2022, desde: <https://www.greenpeace.org/mexico/blog/2490/no-todo-el-plastico-se-recicla-sabes-por-que/>
- Gutiérrez Pescador, J. G. (2013). Biodegradación de polietileno de baja densidad por consorcios microbianos. [Tesis para obtener el título de bióloga, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM].
- Hager, S., Korbula, K., Belec, B., Grusch, M., Pirker, C., Schosserer, M., Liendl, L., Lang, M., Grillari, J., Nowikovsky, K., Pape, V.F. S., Mohr, T., Szakács, G., Keppler, B. K., Berger, W., Kowol, C. R., & Heffeter, P. (2018). The thiosemicarbazone Me₂NNMe₂ induces paraptosis by disrupting the ER thiol redox homeostasis based on protein disulfide isomerase inhibition. *Cell Death Dis.* 9(1052). DOI: 10.1038/s41419-018-1102-z
- Hermida, É. (2011). Polímeros (Cap. 9). Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología - Instituto Nacional de Educación Tecnológica.

- Hollóczki, O., & Gehrke, S. (2020). Can Nanoplastics Alter Cell Membranes? *Chemphyschem*, 21 (1), 9-12. doi: 10.1002/cphc.201900481
- Hu, J., Qin, X., Zhang, J., Zhu, J., Zhu, Y., Zeng, W., Lin, Y., & Liu, X. (2021). Polystyrene microplastics disturb maternal-fetal immune balance and cause reproductive toxicity in pregnant mice. *Reprod. Toxicol.* 106, 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.10.002>
- Huang, T., Zhang, W., Lin, T., Liu, S., Sun, Z., Liu, F., Yuan, Y., Xiang, X., Kuang, H., Yang, B., & Zhang, D. (2022). Maternal exposure to polystyrene nanoplastics during gestation and lactation induces hepatic and testicular toxicity in male mouse offspring. *Food Chem. Toxicol.* 160(112803). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112803>
- Iñiguez, M. E., Conesa, J. A., & Fullana, A. (2017). Microplastics in Spanish Table Salt. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09128-x>
- Jenner, L. C., Rotchell, J. M., Bennett, R. T., Cowen, M., Tentzeris, V., & Sadofsky, L. R. (2022). Detection of microplastics in human lung tissue using μ FTIR spectroscopy. *Sci. Env.* 831(154907). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154907>
- Jenner, L. C., Sadofsky, L. R., Danopoulos, E., Chapman, E., White, D., Jenkins, R. L., & Rotchell, J. M. (2022). Outdoor Atmospheric Microplastics within the Humber Region (United Kingdom): Quantification and Chemical Characterisation of Deposited Particles Present. *Atmosphere.* 13 (2)(265). <https://doi.org/10.3390/atmos13020265>
- Jenner, L. C., Sadofsky, L. R., Danopoulos, E., & Rotchell, J. M. (2021). Household indoor microplastics within the Humber region (United Kingdom): Quantification and chemical characterisation of particles present. *Atmospheric Environ.* 259(118512). <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2021.118512>
- Jin, Z., Wang, W., Jiang, N., Zhang, L., Li, Y., Xu, X., & Zhou, Y. (2015). Clinical Implications of iNOS Levels in Triple-Negative Breast Cancer Responding to Neoadjuvant Chemotherapy. *PLOS ONE.* 10(7). DOI: 10.1371/journal.pone.0130286
- Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C. K., Larat, V., Karbalaei, S., & Salamatinia, B. (2018). Microplastic and mesoplastic contamination in canned sardines and sprats. *Sci. Env.* 612, 1380–1386. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.005

- Kedzierski, M., Lechat, B., Sire, O., Le Maguer, G., Le Tilly, V., & Bruzard, S. (2020). Microplastic contamination of packaged meat: Occurrence and associated risks. *Food Packag. Shelf Life*. 24. doi:10.1016/j.fpsl.2020.100489
- Kosuth, M., Mason, S. A., & Wattenberg, E. V. (2018). Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt. *PLOS ONE*. 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194970>
- Lei, K., Qiao, F., Liu, Q., Wei, Z., Qi, H., Cui, S., Yue, X., Deng, Y., & An, L. (2017). Microplastics releasing from personal care and cosmetic products in China. *Mar. Pollut. Bull.* 123, 122-126. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.09.016>
- Leslie, H. A., van-Velzen, M. J. M., Brandsma, S. H., Dick, A., Garcia-Vallejo, J. J., & Lamoree, M. H. (2022). Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environ. Int.* 163. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199>
- Libera. (2019). Impacto del abandono del plástico en la naturaleza (Ecoembes). Seo BirdLife.
- Liebezeit, G., & Liebezeit, E. (2014). Synthetic particles as contaminants in German beers. *Food Addit. Contam.* 31(9), 1574–1578. doi:10.1080/19440049.2014.945099
- Liu, L., Xu, K., Zhang, B., Ye, Y., Zhang, Q., & Jiang, W. (2021). Cellular internalization and release of polystyrene microplastics and nanoplastics. *Sci. Env.* 779. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146523>
- Lopez Alvarez, E. M. (2019). Métodos para determinar la viabilidad celular con aplicación en odontología. [Trabajo de investigación para optar por el grado académico de bachiller en odontología, Universidad de San Martín de Porres (USMP)].
- López-Macay, A., Fernández-Torres, J., & Zepeda, A. (2016). Principios y aplicaciones de la microscopía láser confocal en la investigación biomédica. *Investigación en Discapacidad*, 5(3), 156-164. <http://www.medigraphic.com/rid>
- Lozano, Y. M., Lehnert, T., Linck, L. T., Lehmann, A., & Rillig, M. C. (2021). Microplastic Shape, Polymer Type, and Concentration Affect Soil Properties and Plant Biomass. *Front. Plant. Sci.* 12:616645. doi: 10.3389/fpls.2021.616645
- Luqman, A., Nugrahapraja, H., Wahyuono, R. A., Islami, I., Haekal, M. H., Fardiansyah, Y., Putri, B. Q., Amalludin, F. I., Rofiqah, E. A., Götz, F., & Wibowo, A. T. (2021). Microplastic

- Contamination in Human Stools, Foods, and Drinking Water Associated with Indonesian Coastal Population. *Env.* 8(138). <https://doi.org/10.3390/environments8120138>
- Madrigal Guzmán, J. F., & Shastri, R. (2011). Manual de plásticos para diseñadores (1ra ed.). Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Magrì, D., Sánchez Moreno, P., Caputo, G., Gatto, F., Veronesi, M., Bardi, G., Catelani, T., Guarnieri, D., Athanassiou, A., Paolo Pompa, P., & Fragouli, D. (2018). Laser Ablation as a Versatile Tool To Mimic Polyethylene Terephthalate Nanoplastic Pollutants: Characterization and Toxicology Assessment. *ACS Nano*. 12, 7690-7700. doi:10.1021/acsnano.8b01331
- Malvern Panalytical. (2022). Dispersión de luz dinámica DLS. Malvern Panalytical. Consultado el 15 de Junio 2022, desde: <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>
- Malvern Panalytical. (2022). Potencial zeta. Malvern Panalytical. Consultado el 16 de Junio 2022, desde: <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/measurement-type/zeta-potential>
- Medrán, M. (2007). Anexo al TEMA 1: Muerte celular. Apoptosis y otras formas alternativas de muerte celular. [PDF]
- Megias, M., Molist, P., & Pombal, M. A. (2019). La célula. 7. Citosol. Citoesqueleto. Filamentos de actina. Atlas de histología Vegetal y Animal. Consultado el 22 de Septiembre 2022, desde: <http://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/7-actina.php>
- Melnik, E. A., Buzulukov, Y. P., Demin, V. F., Demin, V. A., Gmshinski, I. V., Tyshko, N. V., & Tutelyan, V. A. (2013). Transfer of Silver Nanoparticles through the Placenta and Breast Milk during in vivo Experiments on Rats. *Acta Nat.* 5(3), 107-115.
- Monti, D. M., Guarnieri, D., Napolitano, G., Piccoli, R., Netti, P., Fusco, S., & Arciello, A. (2015). Biocompatibility, uptake and endocytosis pathways of polystyrene nanoparticles in primary human renal epithelial cells. *J. Biotechnol.* 193, 3-10. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.11.004
- Morishita, Y., Yoshioka, Y., Takimura, Y., Shimizu, Y., Namba, Y., Nojiri, N., Ishizaka, T., Takao, K., Yamashita, F., Takuma, K., Ago, Y., Nagano, K., Mukai, Y., Kamada, H., Tsunoda, S., Saito, S., Matsuda, T., Hashida, M., Miyakawa, T., ... Tsutsumi, Y. (2016). Distribution of

- Silver Nanoparticles to Breast Milk and Their Biological Effects on Breastfed Offspring Mice. *ACS Nano*. 10(9), 8180-8191. doi:10.1021/acsnano.6b01782
- Mortensen, N. P., Johnson, L. M., Grieger, K. D., Ambroso, J. L., & Fennell, T. R. (2019). Biological Interactions between Nanomaterials and Placental Development and Function Following Oral Exposure. *Reprod. Toxicol.* doi:10.1016/j.reprotox.2019.08.016
- Müller, C., Townsend, K., & Matschullat, J. (2012). Experimental degradation of polymer shopping bags (standard and degradable plastic, and biodegradable) in the gastrointestinal fluids of sea turtles. *Sci. Env.* 416, 464-467. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.10.069>
- National Geographic España. (2022). Planeta o plástico. Consultado el 5 de Junio 2022, desde: <https://www.nationalgeographic.com.es/temas/planeta-o-plastico/fotos/1/2>
- Ó Briain, O., Marques Mendes, A. R., McCarron, S., Healy, M. G., & Morrison, L. (2021). The role of wet wipes and sanitary towels as a source of white microplastic fibers in the marine environment. *Water Res.* 182(116021). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116021>
- The Ocean Cleanup. (2022). The Great Pacific Garbage Patch. The Ocean Cleanup. Consultado el 1 de Marzo 2022, desde: <https://theoceancleanup.com/great-pacific-garbage-patch/>
- Pantoja Munoz, L., Gonzalez Baez, A., Purchase, D., Jones, H., & Garelick, H. (2022). Release of microplastic fibers and fragmentation to billions of nanoplastics from period products: preliminary assessment of potential health implications. *Environ. Sci.: Nano*. 9(606). DOI: 10.1039/d1en00755f
- Parker, B., Andreou, D., Green, I. D., & Britton, J. R. (2020). Microplastics in freshwater fishes: Occurrence, impacts and future perspectives. *Fish and Fisheries*, 22(3), 467-488. doi:10.1111/faf.12528
- PB-L. (2021) . qPROTEIN (BCA). Productos Biológicos. Consultado el 8 de Mayo 2022, desde: <http://www.pb-l.com.ar/wp-content/uploads/2016/07/RA03-qPROTEIN.pdf>
- Perdomo, G. A. (2002). Plásticos y medio ambiente. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 3 (2).
- Pérez Guevara, F., Kutralam Muniasamy, G., & Shruti, V. C. (2021). Critical review on microplastics in fecal matter: Research progress, analytical methods and future outlook. *Sci. Env.* 778(146395). doi:10.1016/j.scitotenv.2021.146

- Pierroz, V., Rubbiani, R., Gentili, C., Patra, M., Mari, C., Gasser, G., & Ferrari, S. (2016). Dual mode of cell death upon the photo-irradiation of a RuII polypyridyl complex in interphase or mitosis. *Chem. Sci.* 7(6115). DOI: 10.1039/c6sc00387g
- PlasticsEurope. (2020). Plastics—The Facts 2020. An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data. EPRO.
- PNUMA (2018). El Estado de los Plásticos—Perspectiva del día mundial del medio ambiente 2018.
- Posada Bustamante, B. (1994). La degradación de los plásticos. *Revista Universidad Eafit*, 94.
- Prata, J. C. (2018). Airborne microplastics: Consequences to human health? *Environ. Pollut.* 234, 115-126. doi:10.1016/j.envpol.2017.11.043
- Prata, J. C., Godoy, V., da Costa, J. P., Calero, M., Martín Lara, M. A., Duarte, A. C., & Rocha Santos, T. (2021). Microplastics and fibers from three areas under different anthropogenic pressures in Douro river. *Sci. Env.* 776(145999).
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145999>
- Ragusa, A., Matta, M., Cristiano, L., Matassa, R., Battaglione, E., Svelato, A., De Luca, C., D'Avino, S., Gulotta, A., Rongioletti, M. C. A., Catalano, P., Santacroce, C., Notarstefano, V., Carnevali, O., Giorgini, E., Vizza, E., Familiari, G., & Nottola, S. A. (2022). Deeply in Plasticenta: Presence of Microplastics in the Intracellular Compartment of Human Placentas. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 19(18). doi: 10.3390/ijerph191811593
- 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. *Environ. Int.* 146(106274). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106274>
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors.* 12, 12347-12360. doi:10.3390/s120912347
- Ranganathan, S., Krishnan, A., & Sivasithamparam, N. D. (2015). Significance of twist and iNOS expression in human breast carcinoma. *Mol. Cell. Biochem.* 412(1-2), 41-47. doi:10.1007/s11010-015-2606-9

- Rapp, J., Herrera, A., Bondyale-Juez, D. R., González-Pleiter, M., Reinold, S., Asensio, M., Matínez, I., & Gómez, M. (2021). Microplastic ingestion in jellyfish *Pelagia noctiluca* (Forsskal, 1775) in the North Atlantic Ocean. *Mar. Pollut. Bull.* 166.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112266>
- Rivas, M., & Beltrán, C. (2018). Invasión plástica. Greenpeace México.
<https://www.greenpeace.org/static/planet4-mexico-stateless/2018/12/a6ca2b8e-invasion-plastica-2.pdf>
- Rivera Garibay, O. O., Álvarez Filip, L., Rivas, M., Garelli Ríos, O., Pérez Cervantes, E., & Estrada Saldívar, N. (2020). Impacto de la contaminación por plástico en áreas naturales protegidas mexicanas. Greenpeace México.
- Rodríguez Bandala, C. (2010). Identificación del receptor SV2 isoforma a en cáncer de mama in vitro e in vivo. [Tesis para obtener el diploma de maestría en ciencias de la salud, Escuela Superior de Medicina IPN].
- Rodríguez Hernández, A. G., Muñoz Tabares, J. A., Aguilar Guzmán, J. C., & Vázquez Duhalt, R. (2019). A novel and simple method for polyethylene terephthalate (PET) nanoparticle production. *Environ. Sci.: Nano.* 6(2031). doi: 10.1039/c9en00365g
- Rubio, L., Barguilla, I., Domenech, J., Marcos, R., & Hernández, A. (2020). Biological effects, including oxidative stress and genotoxic damage, of polystyrene nanoparticles in different human hematopoietic cell lines. *J. Hazard. Mater.* 122900.
doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122900
- Samaniego, R. (2009). Aplicaciones de la microscopía confocal. *GH Continuada*, 8(2), 115-119.
- Schirinzi, G. F., Pérez Pomedá, I., Sanchís, J., Rossini, C., Farré, M., & Barceló, D. (2017). Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environ. Res.* (159), 579-587. doi:10.1016/j.envres.2017.08.043
- Schwabl, P., Köppel, S., Königshofer, P., Bucsics, T., Trauner, M., Reiberger, T., & Liebmann, B. (2019). Detection of Various Microplastics in Human Stool: A Prospective Case Series. *Ann. Intern. Med.* 171 (7), 453-457. doi: 10.7326/M19-0618.

- SEMARNAT. (2018). Océanos, inundados de plástico. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Gobierno de México. Consultado el 2 de Mayo 2022, desde:
<https://www.gob.mx/semarnat/articulos/oceanos-inundados-de-plastico>
- SEMARNAT. (2020). Panorama General de las Tecnologías de Reciclaje de Plásticos en México y en el Mundo. INECC.
- Senathirajah, K., Attwood, S., Bhagwat, G., Carbery, M., Wilson, S., & Palanisami, T. (2021). Estimation of the mass of microplastics ingested – A pivotal first step towards human health risk assessment. *J. Hazard. Mater.* 404. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124004>
- Serpooshan, V., Sheibani, S., Pushparaj, P., Wojcik, M., Jang, A. Y., Santoso, M. R., Jang, J. H., Huang, H., Safavi-Sohi, R., Haghjoo, N., Nejadnik, H., Aghaverdi, H., Vali, H., Kinsella, J. M., Presley, J., Xu, K., Chung-Ming Yang, P., & Mahmoudi, M. (2018). Effect of Cell Sex on Uptake of Nanoparticles: The Overlooked Factor at the Nanobio Interface. *ACS Nano*. 12(3), 2253-2266. doi:10.1021/acsnano.7b06212
- SigmaAldrich. (2020, Abril 17). Griess reagent (modified). MERCK. Consultado el 21 de Junio 2022, desde:
https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/g4410?gclid=CjwKCAjwtcCVBhA0EiwAT1fY771oLzfeJNKVgED4x5OHGbRdYIUmcw_phonEmVE89_Tl0Ix0hRgj6RoCkCIQAvD_BwE
- Solís Reyes, J. P. (2004). Concentración de nitrito como derivado del Óxido Nítrico en fluido sinovial de la articulación metacarpofalángica equina normal y alterada. [Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario, Universidad de Chile].
- Stapleton, P. A. (2021). Microplastic and nanoplastic transfer, accumulation, and toxicity in humans. *Curr. Opin. Toxicol.* 28, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2021.10.001>
- Suasnavas Flores, D. F. (2017). Degradación de materiales plásticos “PET”(polyethylene terephthalate), como alternativa para su gestión [Monografía previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Químicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador].
- Tamargo, A., Molinero, N., Reinoso, J. J., Alcolea Rodriguez, V., Portela, R., Bañares, M. A., Fernández, J. F., & Moreno Arribas, M. (2022). PET microplastics affect human gut

- microbiota communities during simulated gastrointestinal digestion. *Sci. Rep.* 12(528).
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-04489-w>
- Voronovic, E., Skripka, A., Jarockyte, G., Ger, M., Kuciauskas, D., Kaupinis, A., Valius, M., Rotomskis, R., Vetrone, F., & Karabanovas, V. (2021). Uptake of Upconverting Nanoparticles by Breast Cancer Cells: Surface Coating versus the Protein Corona. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(33), 39076–39087. doi:10.1021/acsami.1c10618
- Wahl, A., Le Juge, C., Davranche, M., El Hadri, H., Grassl, B., Reynaud, S., & Gigault, J. (2021). Nanoplastic occurrence in a soil amended with plastic debris. *Chemosphere*, 262(127784). doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127784
- Waller, C. L., Griffiths, H. J., Waluda, C. M., Thorpe, S. E., Loaiza, I., Moreno, B., Pacherras, C. O., & Hughes, K. A. (2017). Microplastics in the Antarctic marine system: An emerging area of research. *Sci. Env.* 598, 220-227. DOI:10.1016/j.scitotenv.2017.03.283
- Wang, F., Wong, C. S., Chen, D., Lu, X., Wang, F., & Zeng, E. Y. (2018). Interaction of toxic chemicals with microplastics: A critical review. *Water Res.* 139. 208–219. doi:10.1016/j.watres.2018.04.003
- Wick, P., Malek, A., Manser, P., Meili, D., Maeder Althaus, X., Diener, L., Diener, P. A., Zisch, A., Krug, H. F., & Von Mandach, U. (2010). Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ. Health Perspect.* 118(3), 432–436. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901200>
- Wilkinson, F. (2020). Microplastics found near Everest's peak, highest ever detected in the world. National Geographic. Consultado el 10 de Mayo 2022, desde: <https://www.nationalgeographic.com/environment/article/microplastics-found-near-everests-peak-highest-ever-detected-world-perpetual-planet>
- Woodall, L. C., Sanchez Vidal, A., Canals, M., Paterson, G.L. J., Coppock, R., Sleight, V., Calafat, A., Rogers, A. D., Narayanaswamy, B. E., & Thompson, R. C. (2014). The deep sea is a major sink for microplastic debris. *R. Soc. Open Sci.* 1: 140317. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.140317>
- Wright, S. L., & Kelly, F. J. (2017). Plastic and human health: a micro issue? *Environ. Sci. Technol.* 51(12), 6634-6647. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00423>

- Yoshida, S., Hiraga, k., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*. 351(6278), 1196-1199. doi:10.1126/science.aad6359
- Yuan, Z., Nag, R., & Cummins, E. (2022). Human health concerns regarding microplastics in the aquatic environment - From marine to food systems. *Sci. Env.* 823(153730).
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153730>
- Zarus, G. M., Muianga, C., Hunter, C., & Pappas, R. S. (2020). A Review of Data for Quantifying Human Exposures to Micro and Nanoplastics and Potential Health Risks. *Sci. Env.* 144010. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144010
- Zhu, F., Zhu, C., Wang, C., & Gu, C. (2019). Occurrence and Ecological Impacts of Microplastics in Soil Systems: A Review. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 102, 741-749.
<https://doi.org/10.1007/s00128-019-02623-z>

Anexos

La figura 19 muestra la distribución de tamaño obtenida mediante DLS para los diferentes medios empleados a lo largo de los experimentos sin y con la adición de nanopartículas. Para determinar el tamaño de las nanopartículas de PET sin la influencia del contenido de los medios, se determinó la distribución de tamaño en agua destilada como se muestra en la figura 19A. Los controles se muestran en color gris, mientras que los medios con nanopartículas de PET se exhiben en color negro.

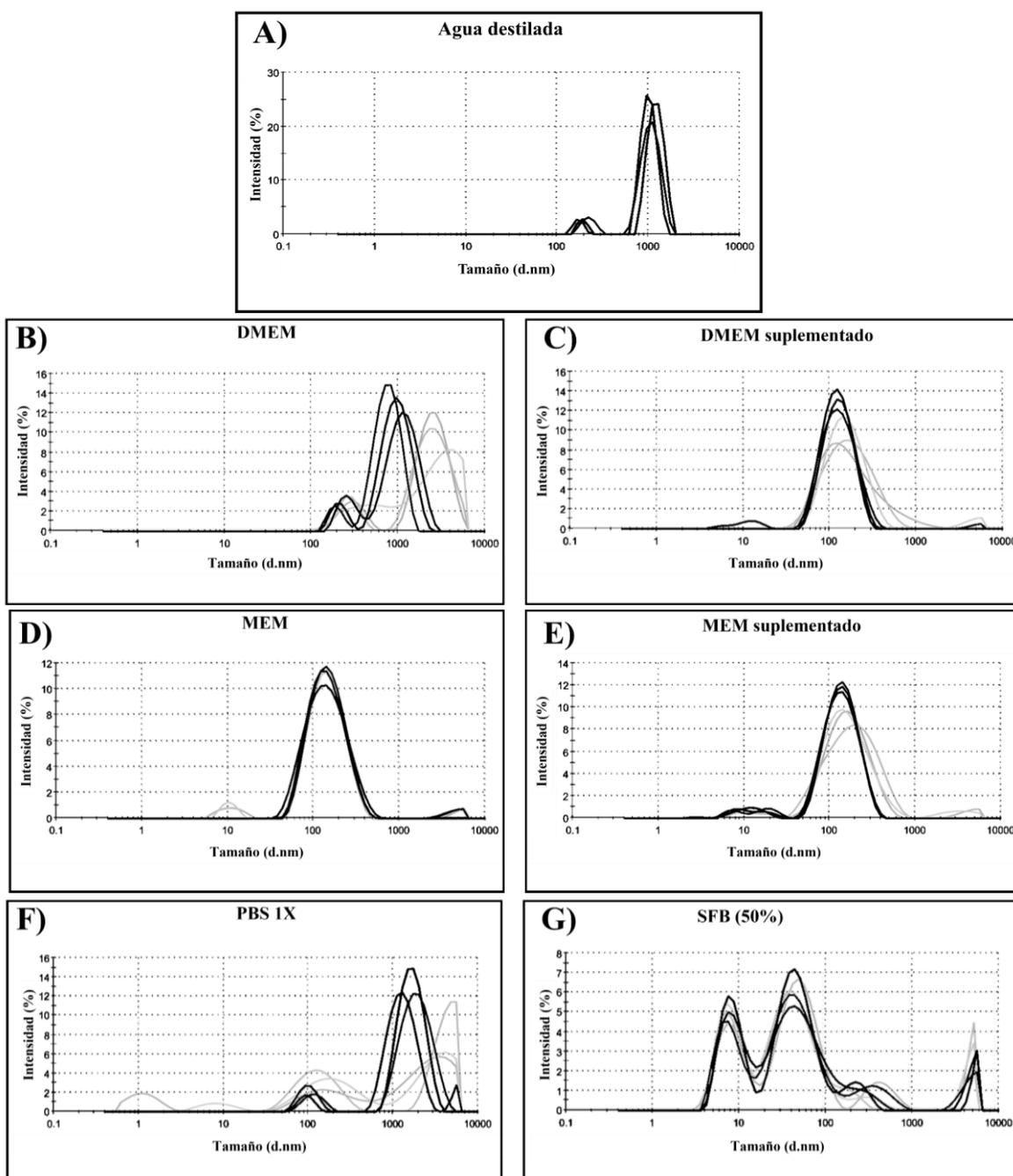


Figura 19. Distribución de tamaño obtenidos por triplicado mediante DLS para los diferentes medios que se emplearon. Con color gris se exhiben los controles y con color negro, los medios con nanopartículas de PET.

Por otra parte, la figura 20 muestra el cambio de color que se dio como resultado de la interacción del reactivo AlamarBlue® con las células metabólicamente activas de un ensayo de viabilidad de 3 días en los pozos correspondientes a 6 concentraciones de nanopartículas de PET y 2 controles, uno de células sin tratamiento (C+) y otro con DMSO (C-).

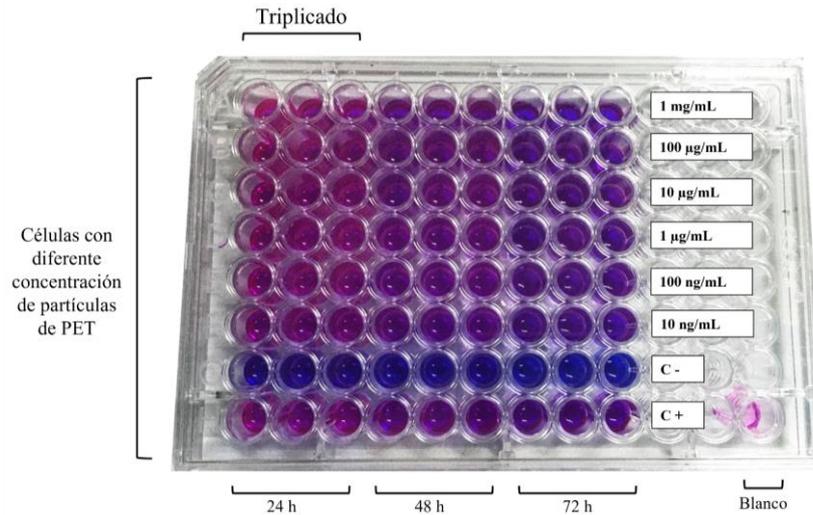
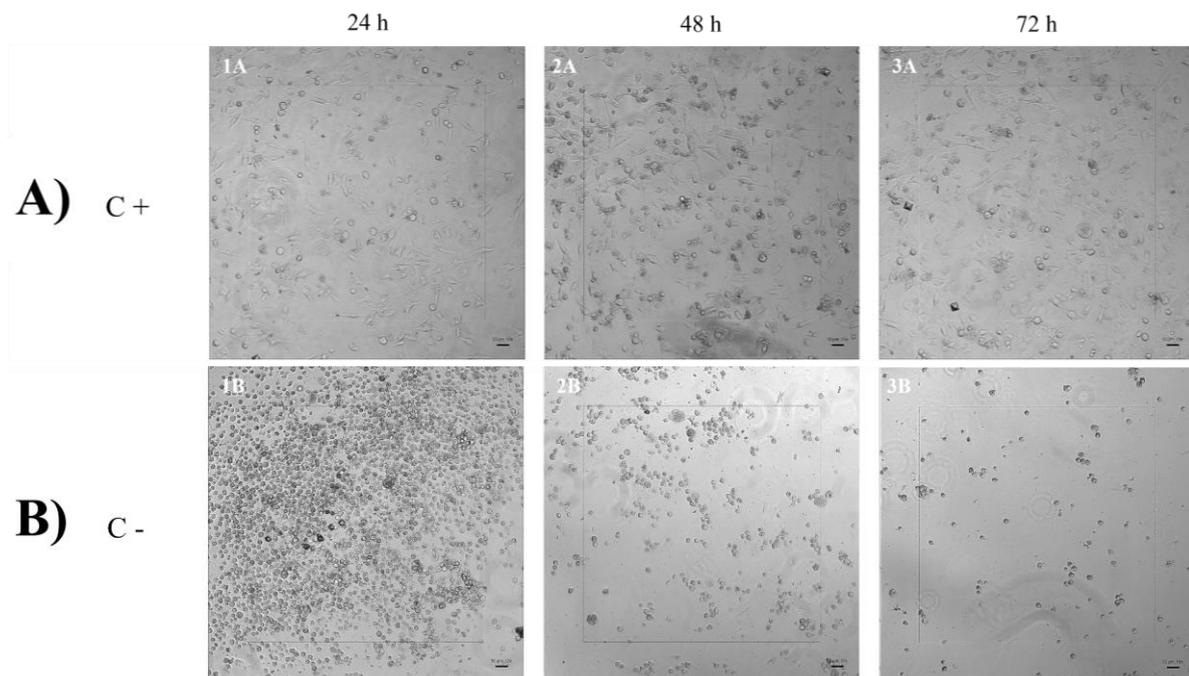


Figura 20. Resultado colorimétrico de un ensayo de viabilidad celular de 3 días con reactivo AlamarBlue®.

Con relación a ello, la figura 23 recopila las micrografías recuperadas mediante microscopía fluorescente de un ensayo de viabilidad de 3 días para los dos controles empleados en las figuras 23A y 23B. Además, las figuras 23C y 23D indican los cambios morfológicos que se tuvieron para células expuestas a nanopartículas de PET de 1 µg/mL y 100 ng/mL correspondientemente. El círculo que se aprecia en la figura 23-1C indica una célula cuya membrana muestra morfología alterada, mientras que los recuadros negros indican acumulación de nanopartículas de PET que rodean la membrana celular.



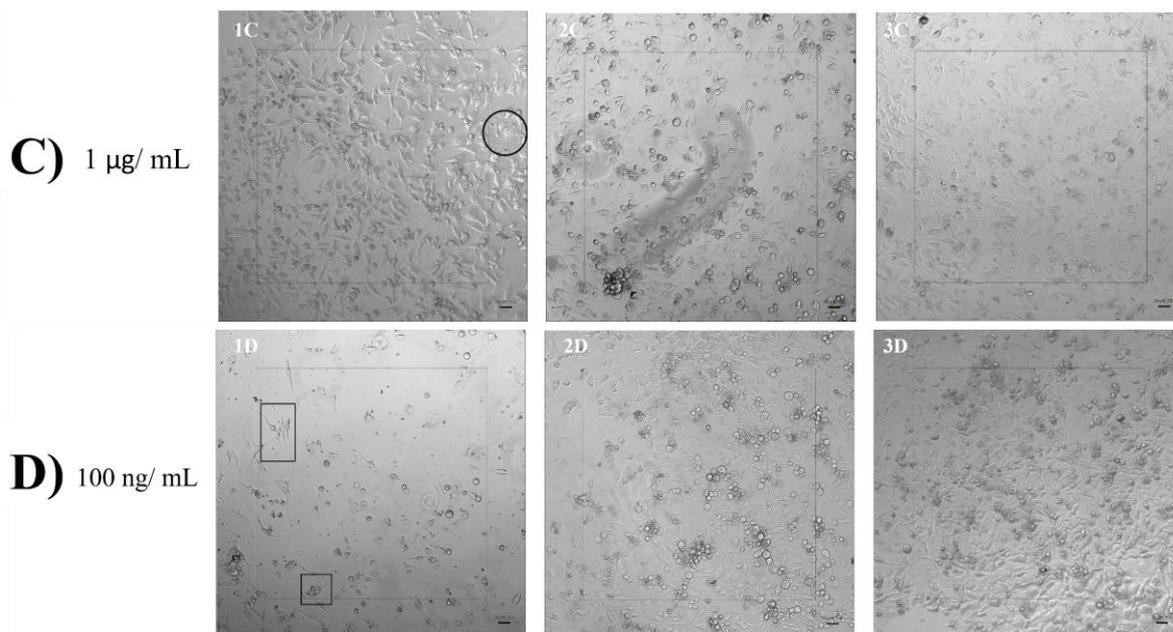


Figura 23. Micrografías obtenidas por microscopía fluorescente que representan la morfología de las células MDA-MB-231 durante 3 días en incubación con 37°C y atmósfera de 5% CO₂ en condiciones **A)** normales sin nanopartículas (**C+**) y **B)** con DMSO sin nanopartículas (**C-**). En las demás micrografías se denotan los cambios morfológicos que tienen con la adición de nanopartículas en concentraciones de **C)** 1 µg/mL y **D)** 100 ng/mL.

Por su parte, las curvas patrón que se emplearon en los ensayos de nitritos y proteína se muestran en la figura 25A y 25B correspondientemente. Mediante ajuste lineal se obtuvo la relación entre la absorbancia y las variables correspondientes; la ecuación que mejor describe el comportamiento de las variables se observa en cada gráfica, así como el coeficiente de determinación R².

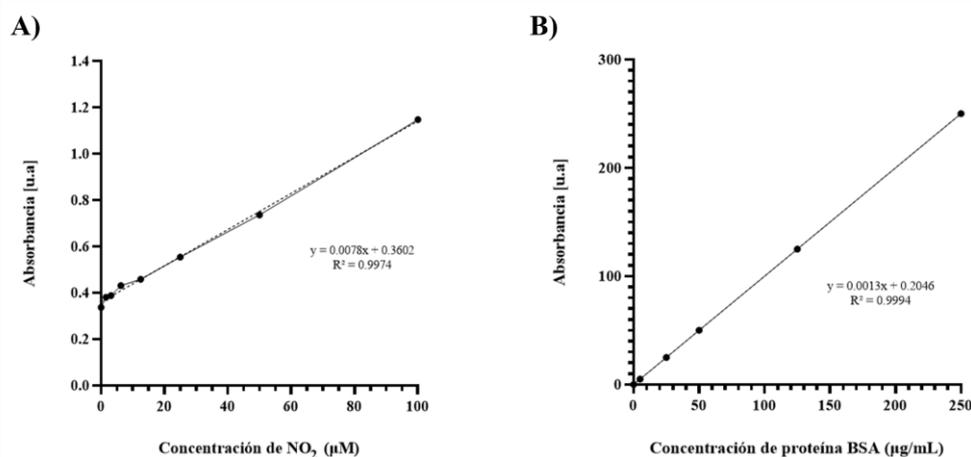


Figura 25. Curvas de respuesta para **A)** ensayo de nitritos y **B)** ensayo de proteínas obtenidos por espectrofotometría. En las gráficas se puede observar el ajuste lineal correspondiente a cada ensayo, así como su coeficiente de determinación R².