

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



Maestría en Ciencias en Nanociencias

**Preparación y caracterización de nanopartículas de
tereftalato de polietileno (PET) y la evaluación de su
toxicidad *in vitro*.**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

José Cristóbal Aguilar Guzmán

Ensenada, Baja California, México
2020

Tesis defendida por

José Cristóbal Aguilar Guzmán

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández

Director de tesis

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno

Dra. Angelica Chiodoni

Dr. Marco Antonio De León Nava



Dr. Sergio Fuentes Moyado

Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dra. Rufina Hernández Martínez

Directora de Estudios de Posgrado

José Cristóbal Aguilar Guzmán © 2020

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **José Cristóbal Aguilar Guzmán** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro Ciencias en Nanociencias

Preparación y caracterización de nanopartículas de tereftalato de polietileno (PET) y la evaluación de su toxicidad *in vitro*.

Resumen aprobado por:

Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández
Director de tesis

La contaminación generada por los desechos de plásticos sintéticos representa un problema para el ambiente y la salud pública, siendo el tereftalato de polietileno (PET) uno de los plásticos más producidos y dispersados en el ambiente. Existe una gran preocupación en el ámbito internacional debido a su presencia en todo tipo de cuerpos de agua, costas y sedimentos, además de su interacción con la biota marina. El PET, a pesar de ser considerado un material resistente, puede ser degradado en ambientes dinámicos como el océano hasta el tamaño de nanopartículas (NPs de PET). El impacto de las NPs de PET sobre organismos complejos ha sido poco explorado y no se conocen sus efectos en células de mamíferos. En la presente investigación, se ha buscado mimetizar la interacción de nanoplásticos con células al lograr preparar y caracterizar exitosamente NPs de PET y determinar los posibles efectos toxicológicos utilizando un modelo de línea celular de macrófagos de ratón (RAW264.7). Las NPs de PET tienen una distribución de tamaño entre 80 y 250nm, con formas y tamaños heterogéneos. Sus propiedades químicas y policristalinidad fueron confirmadas mediante FTIR, XRD y TEM. En los ensayos *in vitro*, se ha demostrado la transición hacia la polarización M1 de macrófagos al interactuar con las NPs de PET en tiempos cortos y a bajas concentraciones, en donde se destaca un aumento de viabilidad que disminuye con el tiempo, el aumento de la producción de ROS, la internalización de las NPs de PET mediante fagocitosis vía TLRs, la producción de citocinas pro-inflamatorias y quimiotaxis en tiempos cortos y una posible activación de la apoptosis en tiempos más largos. Estos resultados sugieren que las NPs de PET podrían afectar los procesos de inflamación mediante la acción directa en los macrófagos.

Palabras clave: NPs de PET, nanotoxicidad, macrófagos, contaminación.

Abstract of the thesis presented by **José Cristóbal Aguilar Guzmán** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

Preparation and characterization of polyethylene terephthalate (PET) nanoparticles and the evaluation of their *in vitro* toxicity

Abstract approved by:

Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández
Thesis Director

The presence of micro- and nanoplastics in marine environments has been considered a significant health global problem in recent years. Polyethylene terephthalate (PET) waste is one of the most common ocean plastic pollutants, and it has been demonstrated his degradation capacity in these dynamic environments. We try to mimic the interaction of these environmental nanopollutants producing PET NPs by top-down acid hydrolysis. PET NPs were carefully characterized in terms of chemical/physical properties. The nanoplastics obtained had a size of 50-250nm dimension, with significant size and shape heterogeneity. FTIR, XRD, and TEM confirmed the PET NPs chemistry and polycrystallinity. In vitro assays with a low concentration of PET NPs, we demonstrated M1 macrophage polarization in short times, with high viability ratio that decreases at the time, increases in ROS production, internalization by phagocytosis via TLRs, cytokine proinflammatory production, and chemotaxis. Moreover, in the case of extended times of PET NPs cell exposition, we confirm the evidence of initial apoptosis activation. These results suggested that PET NPs could affect inflammation processes through direct action on macrophages.

Keywords: PET NPs, nanotoxicology, macrophages, pollution.

Dedicatoria

Dedicada a los amantes de la vida y a los apasionados de la ciencia.

Agradecimientos

A Dios, que con sus infinitas formas me ha bendecido con una vida amable.

A mi familia.

A todos los viejos y nuevos amigos del CNYN y CICESE, en especial a Laura Escalante, Carlos Soto, Edna Arvizu y los socios.

A toda mi generación de Nanociencias, en especial a los tóxicos: Vanessa Castillejos, Fernanda Ortega, Leonardo Lara, Carlos Medrano, Cindy Olivares.

A la Dra. Ana Rodríguez tutora y amiga.

Al comité que se tomó el tiempo para revisar mi trabajo dándome sugerencias y comentarios: Dr. Rafael Vázquez, Dr. Karla Oyuky y Dr. Marco A. De León.

Agradezco al Departamento de Bionanotecnología, en especial a los técnicos de laboratorio, la Dra. Katrin Quester y la M.C. Itandehui Betanzo por su asistencia técnica y disposición en cuanto a materiales y equipos que se utilizaron en del desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Angelica Chiodoni, Dra. Katarzyna Bejtka y Dr. Marco Fontana por su apoyo y amistad en la estancia de investigación que hice durante este proceso en el Instituto Italiano de Tecnología.

A Laura Rosales por su paciencia en cuestiones administrativas y a sus compañeros de oficina Paco y Raúl quienes me brindaron su amistad.

Agradezco al CICESE, a la Dra. Rufina Hernández, directora de estudios de posgrado. Gracias a la atención recibida por parte del Departamento de Estudios Escolares, Dolores Sarracino, Norma Fuentes y Citlali Romero. Un especial agradecimiento a la Lic. Ruth Eaton por la atención recibida en relación con la solicitud de mi beca de maestría.

A mis profesores del posgrado por servir de guía para consolidar mis conocimientos, por apasionarse por su materia y sobre todo por su tiempo.

A mis caseros, Blanca y Guillermo por aguantarme la licenciatura y no correrme hasta que terminara la maestría, excelentes personas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento con los proyectos CB-251241 y IFC-1.

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

Tabla de contenido

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	7
1.2 Justificación	9
1.3 Hipótesis.....	9
1.4 Objetivos	9
1.4.1Objetivo general.....	9
1.4.2 Objetivos específicos.....	9
Capítulo 2. Metodología	9
2.1 Preparación de NPs de PET	10
2.2 Caracterización de NPs de PET	10
2.2.1 Dispersión dinámica de luz.....	10
2.2.2 Microscopía electrónica de transmisión.....	12
2.2.3 Espectrometría infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	15
2.2.4 Espectroscopia de rayos X (XRD).....	17
2.3 Evaluación de la toxicidad de NPs de PET	18
2.3.1 Viabilidad en presencia de NPs de PET	18
2.3.2 Identificación de especies reactivas de oxígeno mediante espectrometría de fluorescencia...	20
2.3.3 Análisis estadístico	21
2.3.4 Microscopía confocal	21
2.3.5 Identificación de ROS	23
2.3.5 Interacción de NPs de PET con macrófagos mediante TEM	24
2.3.6 Identificación de la alteración de expresión genética en macrófagos mediante chips de Microarreglos	26
2.3.6.1 Preparación de muestra	26

2.3.6.2 Aislamiento de ARNm	27
2.3.6.3 Hibridización y análisis de microarreglos	27
Capítulo 3. Resultados	29
3.1 Caracterización de las NPs de PET.....	29
3.1.1 Análisis de NPs mediante DLS	29
3.1.2 Análisis de NPs mediante TEM	29
3.1.3 Análisis de NPs mediante FTIR	30
3.1.3 Análisis de NPs mediante XRD.....	31
3.2 Resultados de la evaluación de la toxicidad de NPs de PET.....	33
3.2.1 Viabilidad y proliferación celular de los macrófagos al interactuar con NPs de PET	33
3.2.2 Identificación de especies reactivas de oxígeno mediante espectrometría de fluorescencia...	33
3.2.3 Dirección de especies reactivas de oxígeno mediante microscopía confocal	34
3.2.4 Internalización de NPs de PET en macrófagos mediante TEM.....	36
3.2.5 Análisis de la alteración de expresión genética en macrófagos mediante chips de Microarreglos	38
Capítulo 4. Discusión	43
4.1 Preparación y caracterización de NPs de PET mediante hidrólisis ácida	43
4.2 Análisis <i>in vitro</i>	44
Capítulo 5. Conclusión	47
Literatura citada	48
Anexos	57

Lista de figuras

Figura 1. Producción anual global de resinas poliméricas y fibras.	1
Figura 2. Producción global acumulada de plástico, medida en toneladas.....	3
Figura 3. Representación de la síntesis química del PET.	4
Figura 4. Representación del diámetro hidrodinámico de una partícula hidratada y solvatada	11
Figura 5. Diagrama esquemático y comparativo de la estructura básica de un microscopio óptico y un microscopio electrónico de transmisión	12
Figura 6. Señales generadas cuando un haz de electrones de alta energía interactúa con una muestra delgada	13
Figura 7. Imagen de TEM de campo oscuro de una placa de poliestireno y su patrón de difracción	14
Figura 8. Esquema experimental de un espectrofotómetro de FTIR.....	16
Figura 9. Deducción de ley de Bragg por diferencia de camino óptico	17
Figura 10. El diagrama de Jablonski	19
Figura 11. Diagrama esquemático de la estructura un microscopio confocal de 3 haces.....	22
Figura 12. Espectro de excitación y emisión característico de los fluoróforos utilizados para diferenciar, el núcleo celular, ROS y NPs de PET	24
Figura 13. Esquema representativo de la creación de un chip de ADN o Microarreglo.....	28
Figura 14. Distribución de volumen de NPs de PET mediante Dispersión Dinámica de Luz.....	29
Figura 15. Micrografías obtenidas mediante TEM de NPs de PET a diferentes magnificaciones.....	30
Figura 16. Espectro de absorbancia FTIR de NPs de PET y una placa de PET extraída de una botella de plástico	31
Figura 17. Patrón de difracción de NPs de PET.....	32
Figura 18. Viabilidad celular de la línea celular RAW 264.7 en presencia de diferentes concentraciones de NPs de PET.....	33
Figura 19. Producción de ROS de la línea celular RAW 264.7 en presencia de diferentes concentraciones de NPs de PET mediante espectroscopía de fluorescencia del fluoróforo DCFDA.	34
Figura 20. Producción de ROS de la línea celular RAW 264.7 presencia de NPs de PET (75 μ M) mediante microscopía confocal.....	35
Figura 21. Secuencia de micrografías a distintas magnificaciones de NPs de PET internalizadas por la línea celular RAW	36

Figura 22. Micrografía de macrófagos de ratón incubados con una concentración de 75 μ M de NPs de PET durante 24, 48 y 72 horas.....	37
Figura 23. Grafica del logaritmo de la señal control X contra la señal del tratamiento con NPs de PET. ..	38
Figura 24. Mapeo de calor de la expresión genética de la línea celular RAW	39
Figura 25. Mecanismo de reacción de la hidrólisis mediante ácidos del PET.....	57

Lista de tablas

Tabla 1. Tipos de termoplásticos más comunes y sus aplicaciones (Geyer et al., 2017).....	2
Tabla 2. Resumen de investigaciones relacionadas con la toxicidad de MPs/NPs de plástico en ensayos <i>in vitro</i>	8
Tabla 3. Proceso de deshidratación de las muestras para TEM	25
Tabla 4. Proceso de infiltración de resina de las muestras para TEM	25
Tabla 5. Parámetros cristalográficos del PET.....	32
Tabla 6. Expresión de genes regulados obtenidos al analizar el efecto de las NPs de PET en macrófagos.	40

Capítulo 1. Introducción

El plástico sintético o semisintético es uno de los materiales más utilizados en la actualidad debido a su gran versatilidad y bajo costo de producción. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define a un plástico como un polímero orgánico de alto peso molecular, derivado de procesos petroquímicos, al cual se le pueden agregar otras sustancias para mejorar su utilidad y/o disminuir su costo de producción (Vert, 2012).

El primer plástico sintético fue producido en 1907, la baquelita. Este hito tuvo tanto éxito que años más tarde en los 1950s, marcó el inicio del rápido crecimiento de la industria de plásticos a nivel mundial. Para 2015, la producción de plástico alcanzó la vertiginosa cantidad de 381 millones de toneladas y se espera que la tendencia siga en aumento (Figura 1).

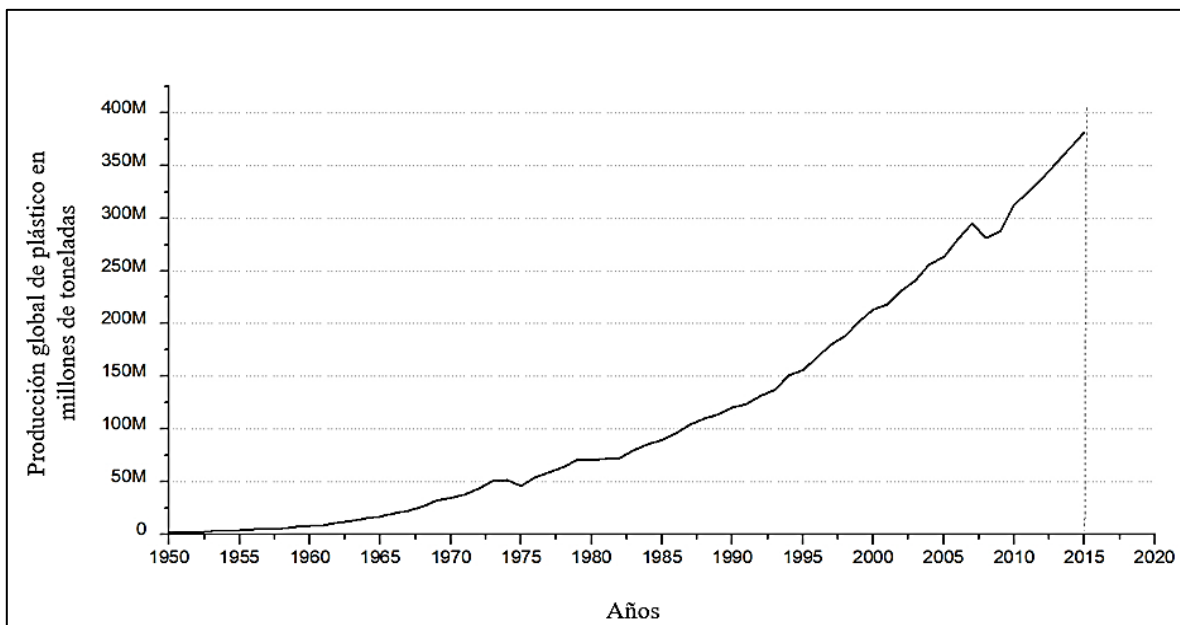




Figura 1. Producción anual global de resinas poliméricas y fibras(plástico), medida en toneladas métricas por año (adaptado de Geyer et al., 2017).

Las propiedades de un plástico dependen de la composición química de sus subunidades, así como de su arreglo atómico y del método industrial de procesamiento. Su composición química incluye elementos tales como el carbono, hidrógeno, nitrógeno, cloro, y azufre. El conjunto de estos átomos, presentes en una celda unitaria, son llamados monómeros. Los monómeros a su vez se enlazan químicamente para dar

lugar a polímeros. Todos los plásticos son polímeros, pero no todos los polímeros son plásticos (Helmenstine, 2018).

Existen tres tipos principales de plásticos: los elastómeros, los termoestables y los termoplásticos. Se conocen como elastómeros a los polímeros con viscoelasticidad y que tienen fuerzas intermoleculares muy bajas, esto significa que tienen por lo general módulos de Young bajos (límite elástico bajo) y alto grado de resistencia a la deformación. Aquellos denominados termoestables son polímeros que luego de solidificar mantienen una forma permanente, presentan una estructura amorfa y se considera que tienen un peso molecular infinito. Y como termoplásticos se conoce a aquellos materiales que pueden ser calentados y remodelados varias veces; algunos suelen ser amorfos y otros pueden presentar cristalinidad. (Helmenstine, 2018). Los termoplásticos más comunes se clasifican de acuerdo con códigos de identificación y con sus potenciales aplicaciones. En la Tabla 1 se observan los termoplásticos más comunes en la industria.

Tabla 1. Tipos de termoplásticos más comunes y sus aplicaciones (Geyer et al., 2017).

Tipos	Códigos de identificación	Aplicaciones	Uso después del reciclado
Tereftalato de polietileno	PET 	Botellas, envasado de productos alimenticios, moquetas y refuerzos neumáticos de coches.	Bolsas, lonas, velas náuticas, cuerdas, hilos, envases etc.
Polietileno de alta densidad	PEAD 	Botellas para productos alimenticios, detergentes, contenedores, juguetes, bolsas, embalajes, películas, laminas y tuberías.	Bolsas industriales, botellas detergentes, contenedores y tubos.
Policloruro de vinilo	PVC 	Marcos de ventanas, tuberías rígidas, revestimientos para suelos, botellas, cables aislantes, tarjetas de crédito, productos de uso sanitario, etc.	Muebles de jardín, tuberías, vallas, contenedores, etc.
Polietileno de baja densidad	PEBD 	Film adhesivo, bolsas, revestimientos de cubos, recubrimientos contenedores flexibles, tuberías de riego, etc.	Bolsas para residuos, e industriales, tubos, contenedores, film uso agrícola, etc.
Polipropileno	PP 	Envases para productos alimenticios, cajas, tapones, piezas de automóviles, alfombras y componentes eléctricos.	Cajas múltiples para transporte de envases, sillas, textiles, etc.
Poliestireno	PS 	Botellas, vasos de yogures y recubrimientos.	Aislamiento térmico, cubos de basura, accesorios de oficina, etc.

Lo que es realmente alarmante es que la mayor cantidad de plástico producido en el mundo se utiliza principalmente para el empaquetamiento de objetos o productos desechables de un solo uso. Esto ha generado una acumulación inconmensurable de residuos; de una magnitud tal, que para 2015 se calculó que la acumulación mundial de desechos plásticos fue de 7.8 millones de toneladas, equivalente a una tonelada de plástico por persona viviente (Figura 2) (Geyer et al., 2017).

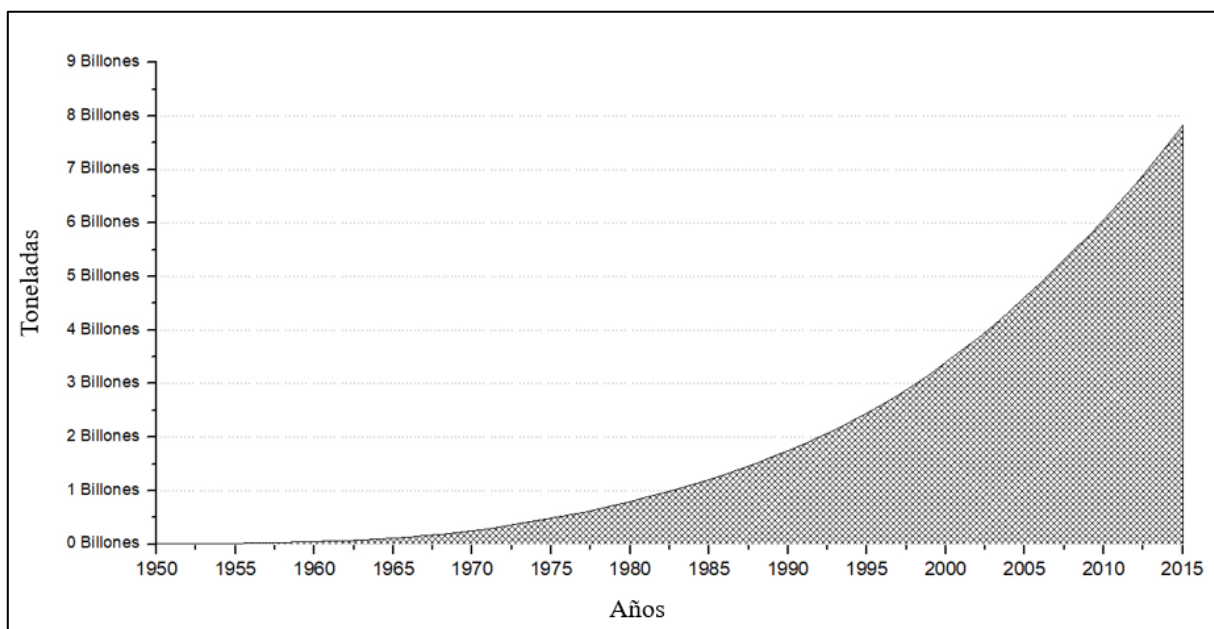


Figura 2. Producción global acumulada de plástico, medida en toneladas (EPRO, 2015).

La acumulación masiva de este material ha provocado su ubicuidad en prácticamente toda la superficie terrestre. La principal muestra de este fenómeno es la presencia de la Gran Isla de Basura del Pacífico, la mayor acumulación de plástico en el océano (Ryan et al., 2009). Este vertedero masivo cuenta con un área superficial de casi 1.6 millones de metros cuadrados (prácticamente la extensión superficial de Texas) y está constituida principalmente por plásticos derivados de la industria pesquera (como las redes de la pesca) y de plásticos de un solo uso provenientes de la superficie (como las bolsas y botellas de plástico). Específicamente y de manera general, estos objetos están fabricados con poliestireno (PS) y tereftalato de polietileno (PET) (da Costa et al., 2016; Masó et al., 2003).

Tereftalato de polietileno (PET)

Este estudio está enfocado en la preparación de nanopartículas de PET (PET NPs), un polímero sintético termoplástico utilizado como contenedor de insumos o redes de pesca que destaca por su transparencia,

flexibilidad e inocuidad. Se produce por la polimerización de etilen glicol y ácido tereftalático. En términos químicos, el etilen glicol es un diol, un alcohol con una estructura molecular que contiene dos grupos hidroxilo (OH), y el ácido tereftalático es un aromático dicarboxílico que contiene un anillo aromático y dos grupos carboxilo (CO₂H). Bajo la influencia del calor y la catálisis, los grupos hidroxilo y carbonilo reaccionan para formar grupos éster (CO-O), los cuales sirven como enlaces químicos que generan la larga cadena del PET. La representación de la reacción se puede observar en la Figura 3 (Adam, 2018).

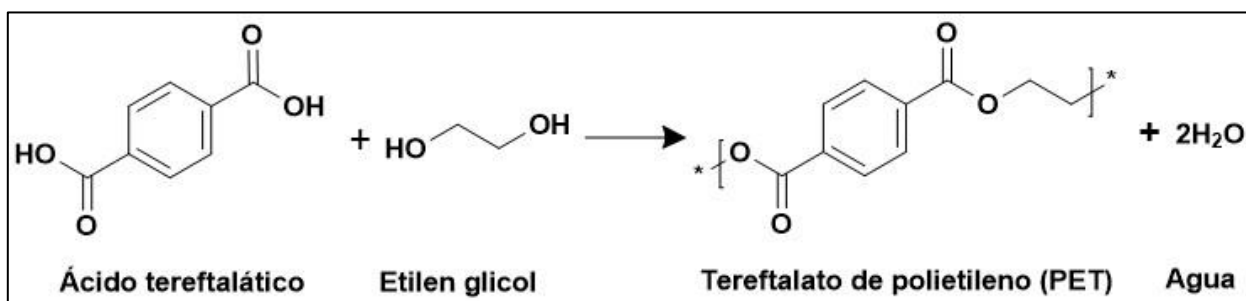


Figura 3. Representación de la síntesis química del PET (Adam, 2018).

A pesar de que los plásticos son considerados materiales resistentes, al ser expuestos a ambientes dinámicos como el océano, son susceptibles a la degradación debido a factores como la radiación ultravioleta, la temperatura y la abrasión mecánica (Singh y Sharma, 2008). Recientes estudios han confirmado la presencia de micro y nanopartículas (MPs y NPs) de plástico en costas, sedimentos y columnas de agua (Dai et al., 2018; Wick et al., 2013). También se ha observado que las MPs y NPs de plástico son vehículos para otros contaminantes, como pesticidas (da Costa et al., 2016), metales pesados o los bifenilos policlorados (Rochman, 2015; Wen et al., 2018); los cuales son adsorbidos en la superficie de diferentes polímeros. Este tipo de complejo (nanopartícula/contaminante) ha sido encontrado entre la basura plástica, con concentraciones 100 veces mayores a las encontradas en los sedimentos y hasta 1 millón de veces más comparadas con la que se ha estimado en el mar (Chelsea M. et al., 2013).

Indudablemente estas MPs y NPs entrarán a la cadena alimenticia por múltiples vías, siendo la ingesta una de las que ha ocasionado mayor preocupación. Existen estudios enfocados en examinar cómo se ingieren o se acumulan los MPs en organismos marinos como mamíferos (Eriksson y Harry, 2003; Fossi et al., 2014, 2012), tortugas (Clukey et al., 2017; Pham et al., 2017), aves (Nicastro et al., 2018; Reynolds y Ryan, 2018) y peces (Boerger et al., 2010), organismos en los que se observan variaciones de comportamiento, fertilidad, daño hepático, respuesta inmune y, daño letal a concentraciones son muy altas.

Interacción de NPs de PET con los humanos

Las MPs y NPs de PET están en contacto con los humanos principalmente por la vía de la alimentación. Se sabe que forman parte de la cadena alimenticia y que tienen la capacidad de permear la barrera intestinal, lo cual podría comprometer nuestra salud. Al formar parte del proceso digestivo podrían atravesar el torrente sanguíneo para distribuirse en todo el cuerpo a través de un complejo de estructuras y órganos que procesan los nutrientes (Groschwitz, 2014; Magrì et al., 2018). Durante este complejo proceso es inminente que interactúen con células del sistema inmunológico que se encargan de lidiar con materiales exógenos, tal es el caso de los macrófagos (Kloc, 2017).

Macrófagos

Los macrófagos son células fagocíticas del sistema inmunológico que se han conservado evolutivamente. Son una de las células más versátiles del cuerpo humano, las cuales, dependiendo de las circunstancias en las que se encuentre, pueden desempeñar un papel activo en la respuesta inmune innata y la adaptativa, inflamación, regeneración de tejidos, pueden sanar, desarrollar o inhibir el cáncer, mantener la homeostasis de los órganos, y sirven de intermediarios entre la madre y los fetos mediante señales químicas (Kloc, 2017). En ese contexto, los macrófagos son objetivos interesantes para aplicaciones terapéuticas y de modulación inmune (Biswas et al., 2006).

Estas células pueden responder a materiales exógeno mediante una gran variedad de sustancias biológicamente activas que se les unen o, en caso de ser una bacteria o parásito, los eliminan. En estas sustancias se incluyen las especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, como el óxido nítrico (NO) o el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y enzimas hidrolíticas, como las metaloproteasas o proteasas (Dzik, 2014; Franceschi et al., 2000; Migone et al., 1995)

Polarización de macrófagos (M1 y M2)

Se han podido identificar dos tipos principales de activación o estados de polarización que han sido definidas en macrófagos de mamíferos: la vía clásica, involucrada en activación/inflamación (M1) y la vía alternativa, relacionada con activación/regeneración (M2) (Gordon, 2003). Estas dos vías de diferenciación y funciones efectoras también se relacionan con las citocinas que producen los linfocitos T colaboradores Th1 y Th2. La vía M1 se ha analizado mediante la observación de la actividad de los macrófagos al interactuar con las citocinas liberadas por los linfocitos Th1: interferón gama (IFN- γ) e interleucina (IL)-2,

o con lipopolisacáridos (LPS) en sepas de ratón, mientras que los linfocitos Th2 difieren en el metabolismo de la arginina mediante la secreción de citocinas, como IL-4, IL-5 e IL-13 (Mills et al., 2000). Recientemente se ha demostrado que la M2 también se activa por la interacción con hongos, parásitos, complejos inmunológicos, proteínas pequeñas, células apoptóticas, IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Sica y Mantovani, 2012).

La activación M1 de macrófagos resulta en: (i) producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS por sus siglas en inglés) para convertir la arginina a citrulina y óxido nítrico (NO) donde los macrófagos tipo M2 utilizan arginina decarboxilasa para convertir arginina a ornitina, la cual es precursora de componentes del colágeno como las poliamidas y prolina, esenciales en la reparación de tejidos (Mills, 2001).; (ii) promueven la formación de mediadores proinflamatorios que incluyen a la interleucina-12 (IL-12), interleucina-1 beta (IL-1 β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucina-18 (IL-18), e interleucina-23 (IL-23); y (iii) promueven una elevada actividad en la presentación de antígenos, que resulta en un fenotipo eficaz para matar patógenos (Sica & Mantovani, 2012; Stein et al., 1992). La activación M2 de los macrófagos resulta en: (i) incremento en la actividad de receptores de manosa; y (ii) producción de citocinas inmunosupresoras como TGF- β e IL-10. Estas citocinas generan un ciclo positivo que incrementa la polarización de los macrófagos vecinos favoreciendo su activación en M2 (Sica y Mantovani, 2012).

Macrófagos de ratón (RAW 264.7)

Los macrófagos derivados de modelos ratón son ampliamente utilizados para el estudio inicial y general de sustancias al medir su efecto potencial *in vivo* o en líneas primarias. La línea celular RAW 264.7, utilizada en este trabajo, refleja la respuesta potencial *de novo* humana, y se utiliza para evaluar la bioactividad efectiva de materiales naturales o sintéticos, en este caso de las NPs de PET. Este tipo de líneas celulares son seleccionadas debido a su estabilidad genética, consistencia fenotípica, disponibilidad, facilidad de mantenimiento y reproducibilidad experimental. El nombre científico del organismo del que fueron extraídos es *Mus Musculus* y el tejido es Tumor inducido por el virus de la leucemia murina de Abelson; ascitis. (Kaur y Dufour, 2012). Diversos parámetros han sido identificados como activadores de la respuesta de un macrófago ante algún material, como el tamaño, la geometría, la superficie topológica, la hidrofobicidad, la química superficial, la mecánica del material y la adsorción de proteínas (Kloc, 2017).

Aunque se tiene un indicio del efecto de las MPs y NPs en organismos, aún es necesario realizar un análisis más profundo de su toxicidad a nivel celular. Por ese motivo, el objetivo de este trabajo es evaluar la

potencial toxicidad de las NPs en células modelo características de la primera línea de defensa de un mamífero, células de epitelio intestinal y macrófagos.

1.1 Antecedentes

En trabajos recientes Magrì y colaboradores (2018) lograron sintetizar NPs de PET de aproximadamente 100 nm mediante ablación láser con el propósito de evaluar su toxicidad en una línea celular epitelial humana. La desventaja de esta técnica es un alto costo de producción y la baja disponibilidad de nanopartículas para hacer una gran cantidad de ensayos *in vitro*, además de los cambios químicos que experimenta el material debido, en parte, a la alta temperatura que es sometido. A pesar de no demostrar un efecto tóxico en los análisis *in vitro* observaron la presencia persistente de las NPs de PET en endolisosomas. También se demostró la alta capacidad de las NPs de PET para cruzar la barrera intestinal, lo que aumenta el potencial riesgo de este tipo de materiales al ser acarreadores de contaminantes (Magrì et al., 2018).

Otra alternativa para la síntesis de NPs de PET fue creada este año por Rodríguez y colaboradores (2019). La técnica involucra una dilución por ácido tricloroacético con la cual se obtienen NPs de entre 50 y 200 nm. También observaron la internalización de NPs de PET en macrófagos de ratón (Rodríguez-Hernández et al., 2019). En el presente trabajo se utilizó esta metodología para la síntesis de NPs de PET.

Recientemente, Chae y colaboradores (2018) han demostrado la transferencia trófica de NPs de poliestireno en cuatro especies de agua dulce (un alga, un crustáceo y dos peces). La mayoría de NPs fueron localizadas en los órganos digestivos y sorprendentemente en el saco vitelino de juveniles eclosionados. Los efectos que encontraron en el caso de los peces, fueron daño hepático y alteraciones conductuales (Chae et al., 2018).

A pesar de que se ha descrito el comportamiento de la línea celular RAW 264.7 al estar en contacto con materiales nanoestructurados con características multivariadas (Magdolenova et al., 2014), aún se conoce muy poco sobre la toxicidad que las NPs de PET podría llegar a presentar, la integración de las investigaciones más recientes con respecto al tema se pueden apreciar en la Tabla 2. Por tal motivo es importante evaluar su grado de toxicidad para determinar el potencial peligro que conlleva su presencia en la cadena trófica.

Tabla 2. Resumen de investigaciones relacionadas con la toxicidad de MPs/NPs de plástico en ensayos *in vitro*.

Modelos de células	MPs/NPs utilizadas	Observaciones	Referencias
Célula mononuclear de sangre periférica (PBMC) U937 (Monocitos humano) THP-1 (Monocitos humanos) DMBM-2 (Macrófagos de ratón)	NPs poliestireno carboxilasas (20-1000 nm)	<ul style="list-style-type: none"> • NPs de 20 nm causan citotoxicidad en U937 y THP-1. • NPs de 20 nm estimulan la producción de IL-8 en monocitos e inducen estrés oxidativo. • NPs de 500 y 1000 nm estimulan la secreción de IL-6 e IL-8. • En el caso de los macrófagos las NPs de 20 nm no causan toxicidad. 	(Prieti et al., 2014)
T98G (Glioblastoma humano) HeLa (Adenocarcinoma cervical humano)	Micropartículas de polietileno (3-16 µm) Partículas de poliestireno	<ul style="list-style-type: none"> • Generación de ROS en altas concentraciones • No hay efectos citotóxicos aparentes en la viabilidad. 	(Schirinzi et al., 2017)
Caco-2 (adenocarcinoma de colon epitelial humano)	NPs de PET (100 nm)	<ul style="list-style-type: none"> • Ningún efecto citotóxico • Internalización en compartimentos endolisosomas • Alta tendencia en atravesar un modelo de barrera intestinal Caco-2 	(Magrì et al., 2018)
Caco-2	Partículas de poliestireno (0.1 y 5 µm)	<ul style="list-style-type: none"> • Poca toxicidad en viabilidad celular, estrés oxidativo, y en la integridad y fluidez de membrana. • Disrupción en el potencial de membrana mitocondrial • Inhibición de la actividad del transportador ABC de ATP 	(Wu et al., 2019)
Fibroblastos dermales humanos Célula mononuclear de sangre periférica (PBMC) HMC-1 (mastocitos humanos) RBL-2h3 (Basófilo de sangre periférica de rata) RAW 264.7 (Macrófagos de ratón)	MPs de polipropileno (~20 µm and 25–200 µm)	<ul style="list-style-type: none"> • Citotoxicidad causada únicamente a altas concentraciones de las partículas más pequeñas de 20µm • Incremento en la producción de histamina en las líneas HMC-1 y RBL-2H3 • ROS causada únicamente a altas concentraciones de las partículas más pequeñas de 20µm 	(Hwang et al., 2019)
BEAS-2B (Epitelio bronquial humano)	NPs de PS (60 nm)	<ul style="list-style-type: none"> • Citotoxicidad solamente a altas concentraciones • Análisis metabólico demostró autofagia y estrés en el metabolismo del retículo endoplásmico. 	(Lim et al., 2019)
A549 (Epitelio alveolar humano tipo 2)	NPs de PS (25 y 70nm)	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución de la viabilidad e inducción del arresto del ciclo celular en altas concentraciones • Sobrerregulación de los transcritos de NF.kB y algunas citocinas proinflamatorias • Alteración en el ciclo celular y en la expresión de proteínas relacionadas con la regulación de la apoptosis 	(Xu et al., 2019)
Hs27 (fibroblastos humanos)	NPs de PS (100nm)	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de ROS en altas concentraciones. • Estrés genotóxico y daño al ADN en altas concentraciones. 	(Poma et al., 2019)
RAW 264.7 (Macrófagos de ratón)	NPs de PET (80 a 50 nm)	<ul style="list-style-type: none"> • Nula toxicidad • Aparentemente llegan hasta el núcleo celular 	(Rodríguez et al., 2019)

1.2 Justificación

La contaminación causada por nanoplásticos representa un riesgo potencial al ambiente y a la salud pública. Aún se desconoce completamente el efecto que los nanoplásticos podrían originar en las células de organismos complejos. Siendo el tereftalato de polietileno (PET) uno de los plásticos más producidos y dispersados en el ambiente es necesario realizar estudios rigurosos sobre su toxicidad.

1.3 Hipótesis

Las nanopartículas de tereftalato de polietileno (NPs de PET), tendrán un efecto nocivo en la respuesta celular de macrófagos de ratón (RAW 264.7) *in vitro*, afectando su viabilidad, mecanismos de internalización, producción de especies reactivas de oxígeno y por consecuencia alteraciones en su expresión genética.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

valuar el daño citotóxico y la expresión genética de macrófagos de ratón RAW 264.7 al estar en contacto con de NPs de PET en un modelo *in vitro*.

1.4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las NPs de PET obtenidas mediante dilución ácida.
- Analizar el efecto de las NPs de PET en la viabilidad celular en ensayos *in vitro*.
- Rastrear la ubicación de las NPs de PET dentro de los macrófagos y determinar el mecanismo con el que se internalizan.
- Relacionar las variaciones en la producción de ROS de macrófagos, con el tiempo de exposición a las NPs de PET.
- Comparar las diferencias en la expresión genética de macrófagos entre las que han estado en presencia con NPs de PET y macrófagos sin estímulo.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Preparación de NPs de PET

Para la preparación de NPs de PET se utilizó como base el protocolo establecido por Rodríguez y colaboradores (Rodríguez-Hernández et al., 2019), la cual se lleva al cabo mediante dilución por ácido. Utilizando una sierra convencional y una botella de PET, se recuperó viruta, para luego ser colada con un tamiz (mesh No. 35, Cole-Parmer Testing Sieve), para obtener 1 g de viruta de menos de 20 mm promedio. Posteriormente, esta viruta se diluyó en 90% de TFA a 50°C en agitación constante por 2 h. Pasado este tiempo se mantuvo en agitación 24 horas a temperatura ambiente y finalmente se agregó TFA a 20%. Más tarde, se agregaron 90 mL de agua Milli-Q® a temperatura ambiente (TA), se centrifugó la muestra a 3,500 rpm por 30 minutos para eliminar los residuos ácidos. Después, se resuspendió el pellet en 100 mL de agua Milli-Q® y fue ultrasonicada con un Ultrasonic homogenizer sound arrest modelo YM-1000Y a 220 V una amplitud del 25 % por 1 minuto, con intervalos de 10 segundos sonicación/descanso. Luego de la sonicación, la muestra fue vertida en una probeta de 1 L, se agregaron 100 mL de dodecilsulfato sódico (SDS 5%) y se aforó con agua Milli-Q®, generando la suspensión de las NPs de PET. La probeta fue recubierta con papel Parafilm, para luego ser agitada vigorosamente durante 10 segundos y se dejó reposar durante toda la noche. Para saber el tamaño de las NPs de PET se extrajeron alícuotas de 1 mL de la probeta en diferentes alturas, las cuales fueran sometidas a un análisis mediante difracción dinámica de luz (DLS). Las fracciones de entre 80 y 250 nm, resultado del ensayo anterior, fueron purificadas mediante centrifugación. Por último, a la muestra total se le realizaron un par de lavados con etanol anhidro en la misma centrífuga, se recuperó, se dejó secar en un vidrio de reloj, para luego ser raspado con una espátula y recuperado en un envase limpio.

2.2 Caracterización de NPs de PET

2.2.1 Dispersión dinámica de luz

La dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés) es una de las técnicas más versátiles y útiles empleadas para la medición indirecta *in situ* de tamaño, distribución de tamaño y en algunos casos de formas de nanopartículas en líquidos (Brown, 1993).

La DLS se basa en el movimiento Browniano, el cual describe la trayectoria aleatoria de partículas al impactar con las moléculas de un solvente líquido. Este movimiento aleatorio es modelado por la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 1).

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t} \quad (1)$$

Donde D_h es el diámetro hidrodinámico, D_t es el coeficiente de difusión traslacional, k_B es la constante de Boltzmann's, T es la temperatura η es la viscosidad dinámica del medio (Edward, 1970).

El radio hidrodinámico es establecido en la DLS como el tamaño de una esfera rígida hipotética que se difunde de la misma manera que la partícula que se mide. De esta forma, este diámetro demuestra el tamaño real de la partícula dinámica hidratada y solvatada (Figura 4A). El coeficiente de difusión traslacional es básicamente el análisis de las fluctuaciones de intensidad que arroja la dispersión de las partículas, dependiendo a su tamaño, al ser iluminadas por un láser (Figura 4B). Teniendo la información de estas variables es posible relacionar el coeficiente transnacional de difusión (D_t) y su relación con el tamaño de partículas basado en el radio hidrodinámico (D_h) para así obtener la distribución de tamaño de NPs en una suspensión (Berne y Pecora, 2000).

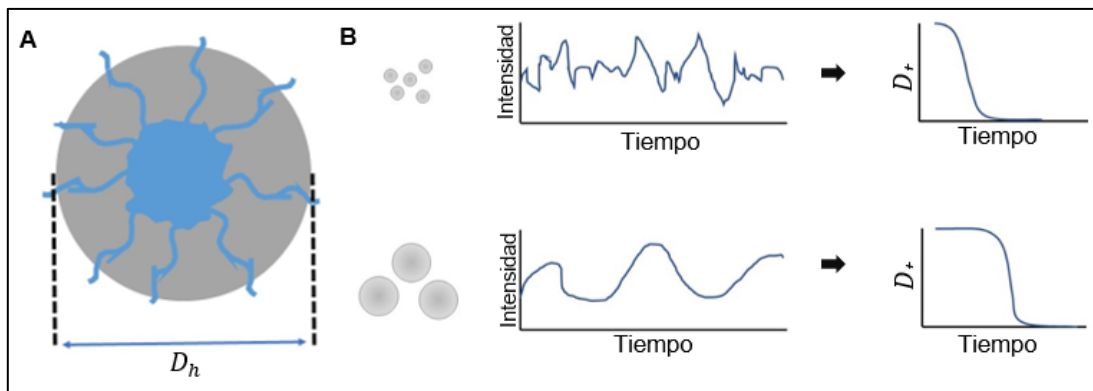


Figura 4. A) Representación del diámetro hidrodinámico de una partícula hidratada y solvatada. B) El coeficiente de difusión traslacional se obtiene al analizar la variación en intensidades, describe que las partículas más pequeñas tienden a difundirse más rápido.

Para tener una idea de la distribución de tamaño de NPs de PET, preparadas en la metodología anterior, se realizó un análisis de DLS con la ayuda de un ZetaSizer NanoZS (Malvern, UK). Estableciendo como

parámetros el medio dispersante como agua, la temperatura ambiente y el material analizado como poliestireno.

2.2.2 Microscopía electrónica de transmisión.

El microscopio electrónico de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) opera con los mismos principios básicos que un microscopio óptico, pero en lugar de luz utiliza electrones y las lentes en lugar de vidrio, son lentes (campos) electromagnéticos. Esto es debido a que la longitud de un electrón es mucho más pequeña que la de la luz y está en función del vacío y el voltaje de aceleración. El TEM puede revelar detalles muy finos de la estructura interna y en ocasiones hasta arreglos atómicos o redes cristalinas. En la Figura 5, se puede observar el esquema de la comparación general entre un microscopio óptico y un microscopio electrónico de transmisión (Bradbury, 2019).

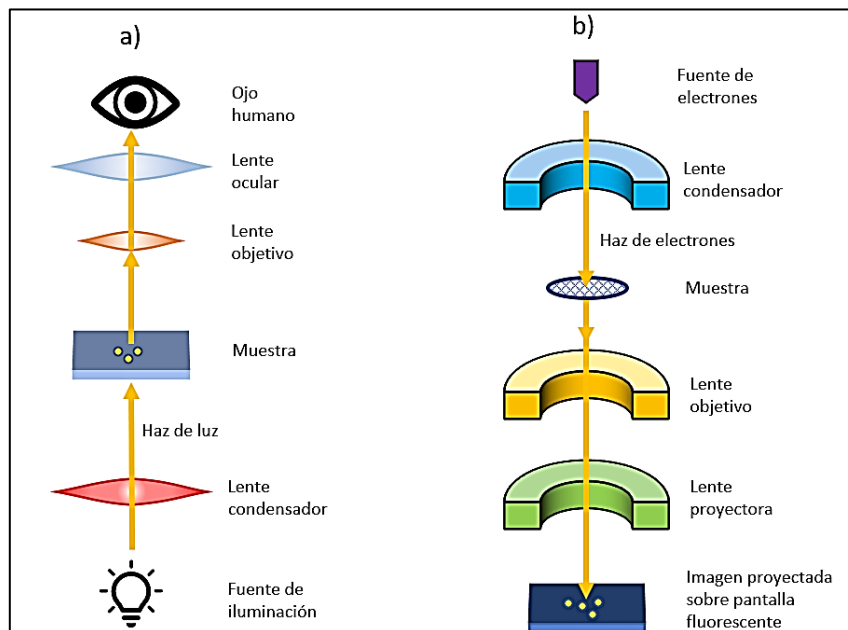


Figura 5. Diagrama esquemático y comparativo de la estructura básica de a) un microscopio óptico y b) un microscopio electrónico de transmisión (Tang & Yang, 2017).

En un TEM tradicional, una muestra delgada es irradiada con un haz de electrones con una densidad de corriente uniforme; la densidad de energía se encuentra entre 60-200 KeV. Los electrones, que normalmente son emitidos por un filamento de tungsteno, son sometidos a un alto potencial que libera

electrones. Un sistema de dos condensadores permite la variación de la apertura de iluminación y un diafragma de condensador la distribución del haz al espécimen. La proyección de la imagen generada es captada por una pantalla fluorescente que puede ser interpretada y enfocada por una cámara digital (CCD) (Tang & Yang, 2017).

El principio básico que fundamenta al TEM es la interacción de los electrones con la materia. Los electrones son un tipo de radiación ionizante, la cual, al transferir energía a los átomos de una muestra, es capaz de eliminar electrones de la capa interna de otros átomos fuertemente unidos a su núcleo. Una de las ventajas de utilizar radiación ionizante es su potencial para producir un amplio rango de señales secundarias de una muestra, algunas de ellas se pueden observar en la Figura 6 (Williams y Carter, 2009).

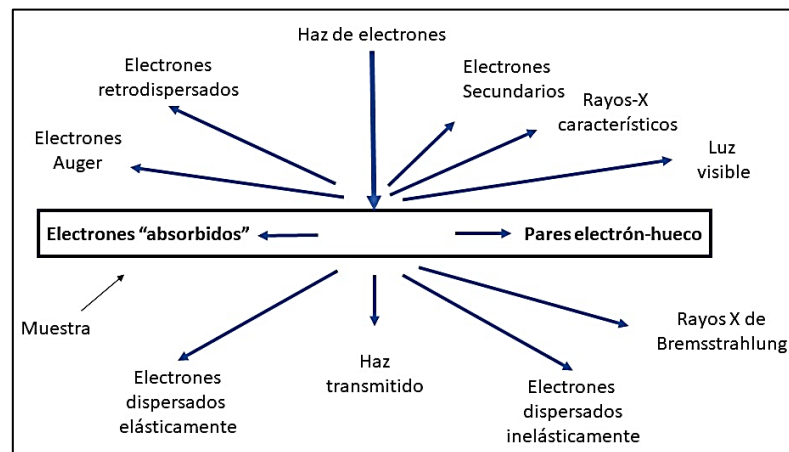


Figura 6. Señales generadas cuando un haz de electrones de alta energía interactúa con una muestra delgada (Williams & Carter, 2009).

La longitud de onda de un electrón es dependiente de la aceleración del voltaje al que son sometidos, la Ecuación 2 define este comportamiento.

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2meV}} \quad (2)$$

Donde λ es la longitud de onda del electrón, h es la constante de Planck (6.626×10^{-34} J s), m es la masa del electrón (9.109×10^{-31} kg), e es la carga del electrón (1.60×10^{-19} C) y V el voltaje de aceleración ($0.5 - 3 \times 10^4$ V). Esto demuestra que entre mayor sea el voltaje de aceleración, menor será la longitud de onda de los electrones y por ende tendremos mayor resolución (Williams y Carter, 2009).

Con estas señales se pueden realizar una variedad de tipos de imágenes, las más común es la imagen de campo claro. En donde en algunas áreas de la muestra, los electrones son dispersados o absorbidos y por eso aparecen zonas más oscuras que otras. En la imagen de campo claro, la apertura del objetivo se utiliza para seleccionar el haz de electrones sin dispersar. Al hacerlo los electrones dispersados se excluyen de formar la imagen. Esta apertura mejora el contraste de la imagen como se observa en la Figura 7A. Ahora bien, también es posible obtener imágenes del patrón difracción, las cuales son el resultado de la dispersión de Bragg cuando el haz pasa a través de una muestra cristalina. Si se inserta una “apertura de difracción de área selecta” para delimitar la región de interés, entonces una imagen creada debajo de la muestra (en la región llamada plano focal posterior) se ve como una matriz de puntos (o un conjunto de anillos difusos). Esta imagen es característica de la muestra analizada ya que es una representación en el espacio recíproco de su estructura cristalina y que ha sido considerada como una “huella digital”, única e irrepetible. Un ejemplo de un patrón de difracción se puede observar en la Figura 7B (Williams y Carter, 2009).

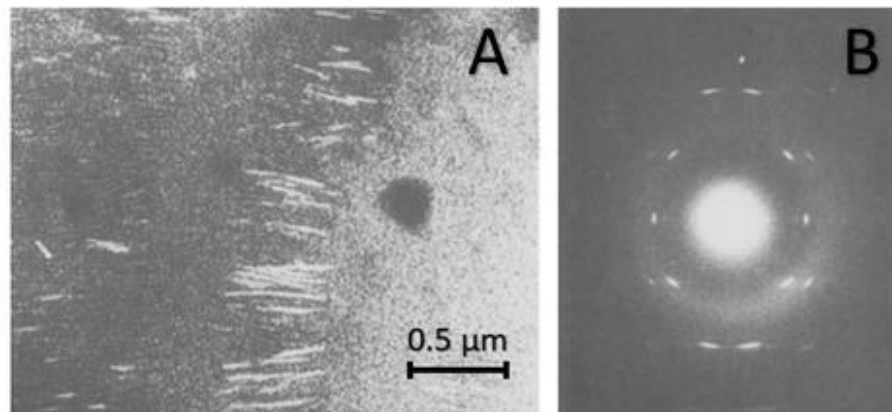


Figura 7. A) Imagen de TEM de campo oscuro de una placa de poliestireno y B) su patrón de difracción (Petermann et al., 1989).

Es importante resaltar que hay un sistema de vacío necesario para que el haz de electrones viaje desde el filamento hasta el detector CCD o pantalla fluorescente. Un sistema de aperturas en los objetivos potencia el contraste de las imágenes, al bloquear los electrones que se desvían del haz central, permitiendo así obtener una imagen con mayor contraste debido a las diferencias de intensidades, ya que se excluyen los haces difractados. Las áreas más oscuras de la imagen representan aquellas regiones de la muestra a través de las cuales pasan (se transmiten) menos electrones, mientras que las zonas más claras de la imagen

representan aquellas áreas de la muestra a través de las cuales se transmitieron más electrones (Tang & Yang, 2017).

Para realizar esta caracterización se depositaron 1 μg de NPs de PET en un mililitro de alcohol etílico absoluto para luego ser ultrasónica durante 10 minutos, pasado este tiempo se recuperó una gota de la solución (5 μL) y se depositó en una rejilla (300 mesh formvar/carbon film). Se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se analizó mediante un TEM modelo Tecnai G2 F20 S-TWIN (FEI) (este es un cañón de emisión de campo, lo que te permite obtener imágenes con resolución atómica) operado a 80 keV. Las micrografías fueron analizadas y editadas utilizando el software ImageJ.

2.2.3 Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) aprovecha el hecho de que algunas moléculas absorben frecuencias específicas que son características de su estructura. Estas absorciones son frecuencias resonantes, esto quiere decir que las frecuencias de la radiación absorbida concuerdan con la frecuencia con la que los enlaces o grupos funcionales vibran. Las energías son determinadas por la forma de la superficie de energía potencial molecular, la masa de los átomos y la asociación de acoplamiento vibracional (Radboud University, 2019).

En un espectrofotómetro de FTIR, la radiación emerge de una fuente y pasa a través de un interferómetro hacia la muestra antes de pasar por un detector, el cual amplifica la señal y filtra la contribución de las altas frecuencias y transforma la información en digital mediante un convertidor análogo a digital. Posteriormente la información es computarizada y sometida a una transformación de Fourier como se observa en el esquema experimental de la Figura 8 (Stuart, 2005).

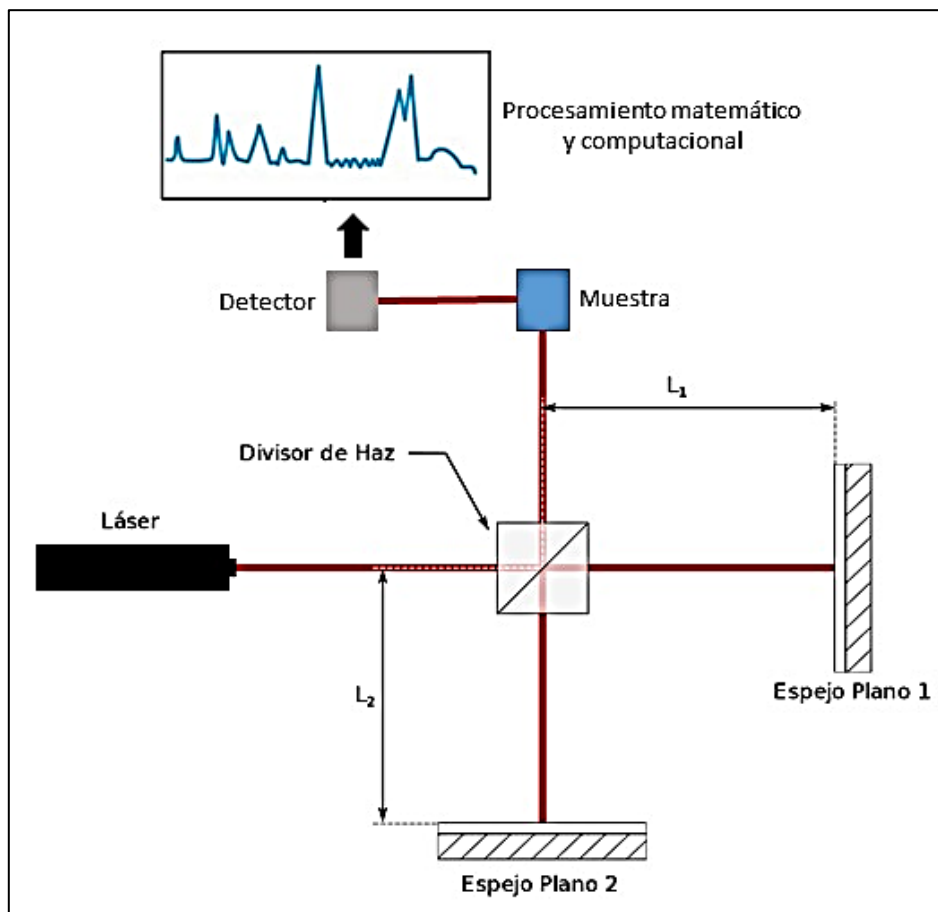


Figura 8. Esquema experimental de un espectrofotómetro de FTIR (Stuart, 2005).

La región del infrarrojo es de $13,000\text{ cm}^{-1}$ a 10 cm^{-1} . Esta región del espectro electromagnético tiene la capacidad de hacer vibrar moléculas orgánicas con grupos funcionales tales como NC-OH, COOH, C=C, CH, NO₂, etc. La mayoría de las bandas de absorción que indican que grupo funcional está presente en una muestra se encuentran en la región $4,000\text{ cm}^{-1}$ a $13,000\text{ cm}^{-1}$. Mientras que las bandas únicas de cada molécula, similares a una huella digital, son encontradas en la región entre $13,000\text{ cm}^{-1}$ a 400 cm^{-1} .

Para realizar esta caracterización se utilizó un espectrofotómetro modelo Bruker TENSOR II con el cual se analizaron las NPs de PET previamente preparadas y una placa plástica de una botella de PET comercial. Los espectros se obtuvieron en un rango de longitud de onda de 600 a $4,000\text{ cm}^{-1}$, con una resolución de 1.4 cm^{-1} y fueron analizados mediante el software Bruker Opus 6.5.

2.2.4 Espectroscopia de rayos X (XRD)

La espectroscopía de rayos X (XRD por sus siglas en inglés) se basa en la capacidad que tienen los cristales para difractar rayos X permitiendo analizar con precisión su estructura y fases cristalinas (Dinnebier y Billinge, 2008).

Los rayos X son ondas electromagnéticas (fotones) de alta energía con una longitud de onda de entre 10^{-3} y 10^1 nm (Spieß et al., 2019). Cuando los fotones de los rayos X interactúan con el material, suceden varios tipos de interacciones relacionadas con la absorción y efectos de dispersión. Uno de los fenómenos que nos interesa es la dispersión elástica, también conocida como dispersión de Rayleigh, la cual ocurre entre fotones y electrones alrededor del núcleo atómico. Esto es importante porque la energía de la onda dispersada no cambia es decir mantiene su fase en relación con la onda incidente (Dinnebier y Billinge, 2008).

Dicho esto, el principio de este método se basa en la difracción de rayos X producida por los planos atómicos periódicos y el ángulo en el que están orientados, o en la energía resuelta de la señal detectada. El arreglo geométrico con el que se interpreta el fenómeno de la XRD ha sido descrito por W. L. Bragg (Bragg, 1929). En la Figura 9 se pueden observar los detalles de la condición geométrica para la difracción y la determinación de la ley de Bragg's.

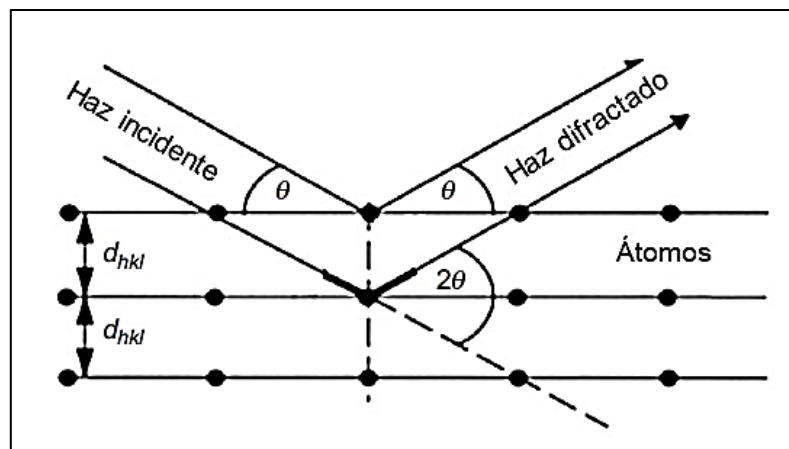


Figura 9. Deducción de ley de Bragg por diferencia de camino óptico (Spieß et al., 2019).

La Ley de Bragg está dada por la Ecuación 3.

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin(\theta) \quad (3)$$

En donde n es el orden de difracción, λ es la longitud de onda del haz incidente en nm, d_{hkl} es el espacio entre planos en nm y θ el ángulo en el que el haz difractó en grados.

Para realizar esta caracterización de las NPs de PET mediante la técnica de XRD se utilizó un difractómetro XPERT PRO, un goniómetro PW3050/60 y se analizó utilizando el software misura *BB*. Los parámetros utilizados fueron los siguientes: El ángulo de haz incidente fue de 20° a 90° y el ánodo del material utilizado para producir los rayos X fue el cobre con una longitud de onda de irradiación de K_α de 0.154.

2.3 Evaluación de la toxicidad de NPs de PET

Las condiciones de cultivo de la línea celular seleccionada para nuestro estudio RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) fueron: atmosfera de 37°C y 5% de CO₂. El mantenimiento y subcultivo de la línea celular, se llevó al cabo con medio (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) DMEM (SIGMA-ALDRICH) adicionado con 10% suero fetal bovino (BIOWEST) y 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina y estreptomina, SIGMA-ALDRICH).

2.3.1 Viabilidad en presencia de NPs de PET

Algunos materiales son capaces de absorber energía y luego emitir luz visible en un fenómeno físico conocido como luminiscencia. Los fotones de esta luz emitida son generados por transiciones electrónicas en el sólido. Lo que sucede es que los electrones externos de los átomos de materiales luminiscentes aprovechan energía de la longitud de onda específica a la que son irradiados para promoverse de su estado fundamental a un estado de energía excitado; momentos después al no encontrarse estables, decaen a un estado de menor energía lo cual genera la emisión de luz visible (Callister et al., 2007).

La luminiscencia se puede clasificar de acuerdo con la magnitud del tiempo de retardo entre los eventos de absorción y emisión. Si la emisión ocurre por momentos mucho menores a 1s, el fenómeno se conoce como fluorescencia; para tiempos mayores, es llamado fosforescencia (Callister et al., 2007). En la Figura 10 se observa el diagrama de Jablonski en donde se representan los principios electrónicos que dan lugar a la fluorescencia y a la fosforescencia.

La fluorescencia más intensa y la más útil es la que presentan los fluorocromos, compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos comúnmente conocidos como fluoróforos o tintes fluorescentes. Este tipo de moléculas contienen estructuras alicíclicas de carbonilo, alifáticas o con dobles enlaces muy conjugados. La intensidad de la fluorescencia puede ser influenciada por diversos factores como: su rigidez estructural, la temperatura y disolvente, el efecto del pH y su concentración (Valeur, 2001).

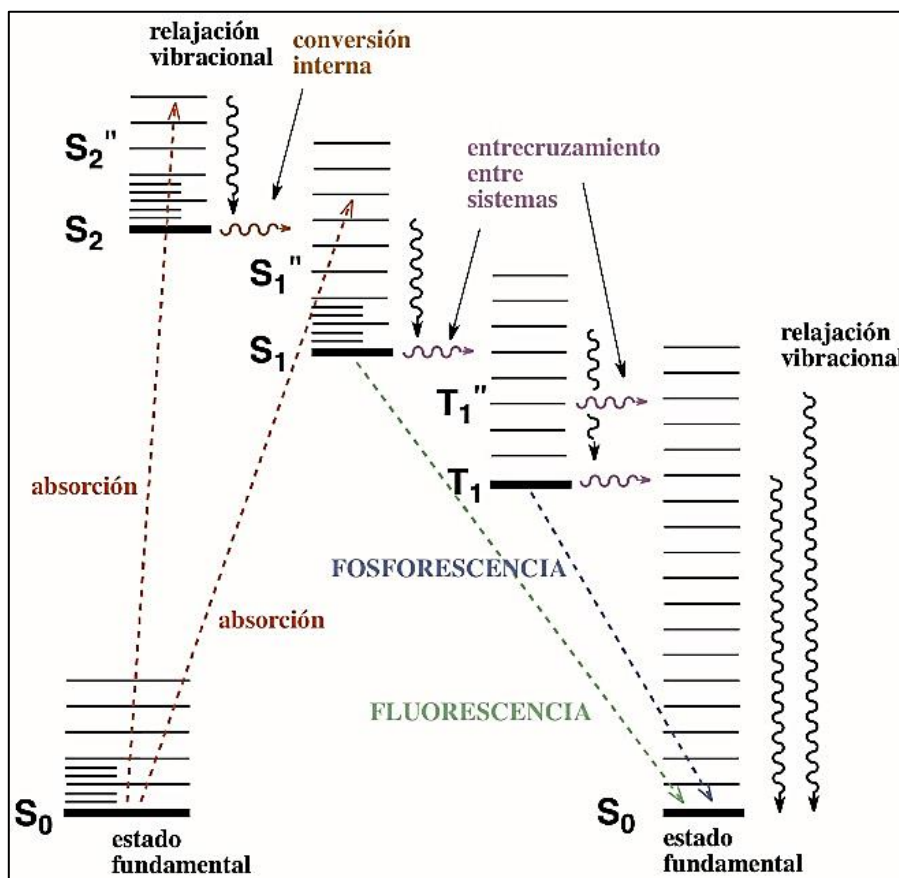


Figura 10. El diagrama de Jablonski permite visualizar los procesos de sufre una molécula luego de ser irradiada con luz: absorción fotónica y excitación del estado fundamental (S_0) a un nivel energético electrónico, vibracional o rotacional superior (S_2), y recuperación del estado fundamental S_0 a través de diferentes estados electrónicos singlete S_1 y/o triplete T_1 , con emisión de fluorescencia o fosforescencia, de acuerdo con las propiedades del material (Grupo GIDOLQUIM, 2014).

Existen varios factores que pueden inducir una disminución en la intensidad de la fluorescencia emitida por una determinada sustancia (quenching), tales como reacciones en estado excitado, transferencia de energía, formación de complejos y colisiones moleculares, por lo tanto, son dependientes de la presión y la temperatura (Valeur, 2001)

La viabilidad celular es la cuantificación del número de células vivas dentro de una población al comparar células estimuladas con nanopartículas y sus respectivos controles, lo cual puede brindar información sobre la salud y actividad general de una célula frente a un estímulo. Para realizar ensayos de viabilidad, es común utilizar reactivos los cuáles luego de ser metabolizados por las células “viables” o saludables, presentan fluorescencia la cual puede ser censada y posteriormente analizada (Khan, 2018).

Para determinar la viabilidad de la línea celular RAW 264.7 en presencia de NPs de PET en distintas concentraciones, se realizó un ensayo colorimétrico utilizando el reactivo AlamarBlue® (SigmaAldrich), el cual contiene el compuesto resazurina, de color azul, que puede ser reducido por células viables a resorufina, de color rosa. Se colocaron por triplicado los siguientes pozos prueba: 300, 150, 75 y 37.5 μM de NPs de PET (utilizando el peso molecular del PET: 192), además de los correspondientes pozos Control negativo (células sin tratamiento), control positivo (células con DMSO) y el medio con 300 μM de NPs de PET para visualizar la posible autofluorescencia etiquetado como “NPsPET”. A cada prueba se colocaron 10,000 células exceptuando el último y se incubaron por 24, 48 y 72 horas a 37°C y 5% de CO_2 . 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 37°C y 5% de CO_2 . A continuación, se realizó la lectura de 100 μL del medio de cultivo de cada pozo mediante fluorimetría con una longitud de onda de excitación de 560 nm y emisión de 590 nm utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia Agilent modelo Cary Eclipse. Finalmente, se analizaron los datos con el software Graph Prism 6 con un análisis ANOVA de $P < 0.05$. Cabe destacar que antes de realizar estos experimentos se realizaron ensayos con concentraciones exponenciales para así optar por aquellas que tenían efectos más pronunciados además de que no interfirieran con las mediciones o saturaran las placas de cultivo.

2.3.2 Identificación de especies reactivas de oxígeno mediante espectrometría de fluorescencia

Las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) son moléculas mensajeras que regulan una amplia variedad de procesos fisiológicos celulares incluyendo la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Di Meo et al., 2016). La sobreproducción de ROS, tal como el peróxido de hidrógeno o los radicales libres, pueden llegar a causar daño irreversible a macromoléculas, bloqueos completos en la señalización, inhibición de la proliferación, envejecimientos, estrés oxidativo en las mitocondrias, daño al ADN mitocondrial, inflamación crónica y en muy altos niveles la muerte celular ya sea por apoptosis o necrosis (Di Meo et al., 2016; Lim et al., 2019; Mikhed et al., 2015; Schmidt et al., 2015).

Para identificar las ROS se realizó la técnica de espectroscopia de fluorescencia utilizando el reactivo diacetato de 2',7' –diclorofluoresceína (DCFDA-abcam). El cual, luego de penetrar dentro de la célula en forma de DCFDA es desacetilado por esterasas celulares a un compuesto no fluorescente, el cual al ser oxidado por las ROS se transforma en 2',7' –diclorofluoresceína (DCF). La DCF es un compuesto altamente fluorescente y puede ser detectado mediante espectroscopía de fluorescencia.

En este experimento se incubaron 10,000 células por pozo en una placa de 96 pozos durante toda la noche a 37°C y 5% de CO₂, para línea celular RAW 264.7. Pasado este tiempo se retiró el medio, se realizaron lavados con PBS 1X antes y después de agregar el fluoróforo DCFDA a 17 µM, con el cual se incubaron las células durante 30 minutos protegidas de la luz a 37°C y una atmosfera de 5% de CO₂. Listo este punto se pasó a montar los pozos prueba, en los que se pusieron en contacto las líneas celulares con NPs de PET en distintas concentraciones (300, 150, 75 y 37.5 µM), junto con un pozo control negativo sin estímulos y uno control positivo con hidróperóxido de terc-butilo (TBHP), comúnmente utilizado para la activación de la producción de ROS en células. Se incubaron durante 24 horas protegida de la luz a 37°C y una atmosfera de 5% de CO₂. Pasado este tiempo se realizó una medición de fluorescencia 485/535 nm (Excitación/Emisión). Utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia Agilent modelo Cary Eclipse. Se repitió la medición a las 48 y 72 horas.

2.3.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los ensayos de viabilidad y ROS, con una n =3, fueron procesados con el software Graph Prism 6 con el que se realizó análisis ANOVA de P<0.05.

2.3.4 Microscopía confocal

La microscopía confocal es una especialización de la microscopía estándar de epifluorescencia que utiliza un arreglo óptico particular el cual genera imágenes de alta resolución de materiales teñidos con sustancias fluorescentes. Es ampliamente utilizada para analizar células vivas, fijas o secciones de tejidos que se puedan marcar con diversos fluoróforos (Peterson, 2010).

Esta tecnología utiliza un láser (amplificación de la luz por la emisión estimulada de radiación) (Hecht, 2018), un dispositivo que estimula a los átomos o moléculas para que emitan luz a determinadas longitudes de onda, lo cual hace que sea amplificada, produciendo típicamente un haz de radiación muy característico. La emisión generalmente cubre un rango extremadamente limitado de longitudes de onda visible, infrarroja o ultravioleta. Se han desarrollado muchos tipos diferentes de láseres, con características muy variadas.

En la Figura 11 se puede observar la representación esquemática de la técnica. En lugar de iluminar toda la muestra a la vez, la luz láser se enfoca en un punto definido a una profundidad específica dentro de la muestra. Esto conduce a la emisión de luz fluorescente en exactamente este punto. Un agujero dentro de la vía óptica corta las señales que están fuera de foco (pinhole-Apertura P1), lo que permite que solo las señales de fluorescencia del punto iluminado entren en el detector de luz conocido como fotomultiplicador el cuál amplificará la señal y la interpretará traduciendo la intensidad de la fluorescencia como señales eléctricas, finalmente, para recrear una imagen con esta información se utiliza un software especial (Valeur, 2001).

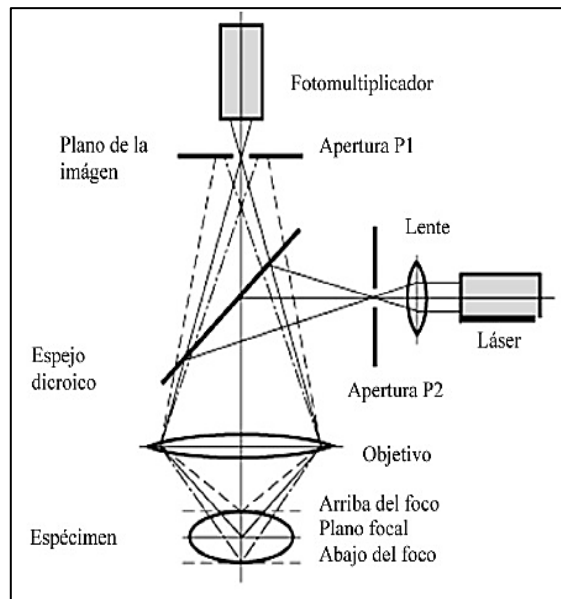


Figura 11. Diagrama esquemático de la estructura un microscopio confocal de 3 haces (Peterson, 2010).

Al escanear la muestra en un patrón ráster, se crean imágenes de un solo plano óptico. Es posible recrear objetos 3D al escanear varios planos ópticos y apilarlos utilizando un software de deconvolución renderización de microscopía adecuado (z-stack). También es posible analizar tinciones de

inmunofluorescencia multicolor utilizando microscopios confocales de última generación que incluyen varios láseres y filtros de emisión / excitación (Peterson, 2010).

2.3.5 Identificación de ROS

Para demostrar la producción de ROS de manera cualitativa se realizó un ensayo de fluorescencia mediante microscopía confocal. En primer lugar, las NPs de PET fueron teñidas utilizando el colorante rojo Nilo. Para lo cual, se agregaron 10 μL de rojo Nilo a 10 g/mL a un vial con NPs de PET a 75 μM y se dejaron a agitación constante por toda una noche. Finalmente se lavaron con 70% de etanol para eliminar todo el pigmento que no se absorbió.

Posteriormente y bajo campana de flujo laminar, 12 portaobjetos circulares de vidrio fueron limpiados con etanol anhidro y esterilizados con UV por 20 minutos, para luego ser funcionalizadas con Poli-L-lisina al 10% en PBS 1X durante 20 minutos. Completando el tiempo fueron lavados con medio de cultivo y depositados en una placa de 12 pozos, en los cuales se sembraron 10,000 células por pozo y se dejaron incubar toda la noche a 37°C y con una atmosfera de 5% CO_2 . Pasado este tiempo se retiró el medio de cultivo, se lavaron los pozos con PBS 1X, se agregaron 100 μL de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA) a 17 μM y se incubaron durante 45 minutos. Posteriormente se realizó otro lavado con PBS 1X para retirar los excedentes y se agregó medio de cultivo fresco. A continuación, se agregaron 75 μM de NPs de PET teñidas con rojo Nilo a los pozos de prueba correspondientes y se dejaron incubar por 24, 48 y 72 horas. Pasado cada tiempo se retiró el medio de cultivo y se lavaron las placas con PBS 1X, para luego agregar metanol a -20°C para fijar a las células durante 20 min, al concluir este tiempo se realizaron 3 lavados con PBS 1X, PBS 1X con Tween 0.3% para luego agregar DAPI a 17 μM a cada pozo el cuál se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente. El DAPI es un fluoróforo que se une fuertemente a las hebras de ADN bicatenario. Posteriormente se realizaron lavados con PBS 1X. Luego se prepararon portaobjetos previamente esterilizados para depositar una gota de glicerol más PBS 1X (50/50) en la que se depositaron los cubreobjetos antes realizados y se sellaron con esmalte de uñas transparente.

Listas las muestras, fueron observadas con un microscopio confocal Olympus fv1000 utilizando la emisión y la excitación de los colorantes mostrados en la Figura 12. Finalmente, las imágenes fueron procesadas mediante el software imageJ.

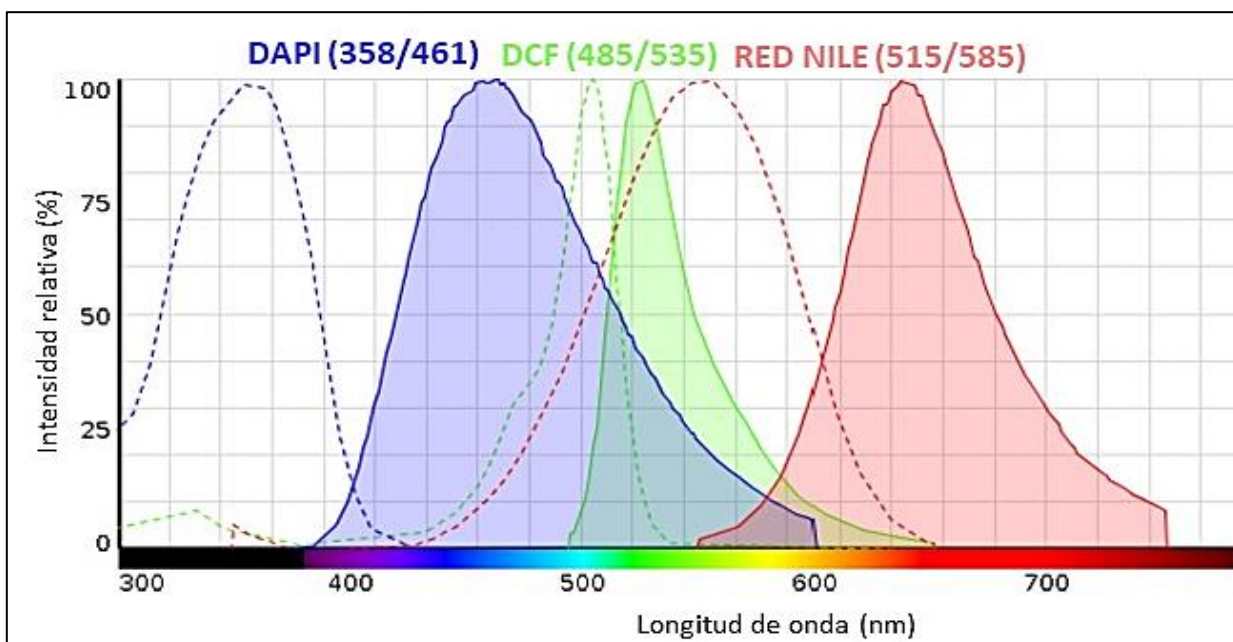


Figura 12. Espectro de excitación y emisión característico de los fluoróforos utilizados para diferenciar, el núcleo celular (azul), ROS (verde) y NPs de PET (rojo).

2.3.5 Interacción de NPs de PET con macrófagos mediante TEM

Para observar las células a mayor aumento, se recurrió a TEM. Para esto se sembraron macrófagos en 6 placas de (diámetro) (1.5×10^6 /placa) y se incubaron durante 2 horas a 37°C y 5% de CO_2 . A tres placas se le agregaron NPs de PET en equivalencia a $75 \mu\text{M}$ de NPs de PET y se incubaron durante 24, 48 y 72 horas con su respectivo control a 37°C y 5% de CO_2 . Se eligió esta concentración debido a los resultados obtenidos en la viabilidad celular. Pasado su respectivo tiempo de incubación, cada placa fue lavada con un buffer de fosfatos (PBS 1X) y fijada con glutaraldehído (4% v/v) durante 1 hora a 4°C , posteriormente las células fueron lavadas nuevamente con PBS 1X, despegadas mecánicamente y lavadas en dos ocasiones. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se realizó una postfijación con 10 ml de Tetraóxido de osmio (OsO_4 1%v/v) durante 2 horas RT. Pasado este tiempo se realizó el proceso de deshidratación con etanol a diferentes concentraciones como se describe en la Tabla 3.

Tabla 3. Proceso de deshidratación de las muestras para TEM

Solución	Tiempo	Temperatura
H ₂ O MQ	10min	TA
H ₂ O MQ	10min	TA
50% Etanol	10min	4°C
60% Etanol	10min	4°C
70% Etanol	10min	4°C
80% Etanol	10min	4°C
90% Etanol	10min	4°C
96% Etanol	10min	4°C
100% Etanol	15min	4°C
100% Etanol	20min	4°C
100% Etanol	30min	4°C

Ya polimerizadas las muestras fueron sometidas a ultramicrotomía mediante un microtomo marca Leica modelo Ultracut R, con cortes de aproximadamente 50 nm y soportados en rejillas (300 mesh formvar/carbon coated grid) y posteriormente se analizó mediante un microscopio electrónico de transmisión modelo Tecnai G2 F20 S-TWIN (FEI) operado a 80 keV. Las micrografías se analizaron mediante el software ImageJ.

Tabla 4. Proceso de infiltración de resina de las muestras para TEM

Solución de resina	Tiempo	Temperatura
15%	4 horas	TA
30%	4 horas	TA
50%	Toda la noche	TA
75%	4 horas	TA
100%	Toda la noche	TA
100%	15min	4°C
100%	20min	4°C
100%	30min	4°C

2.3.6 Identificación de la alteración de expresión genética en macrófagos mediante chips de Microarreglos

Los microarreglos de ADN (chip de ADN) son una técnica de biología molecular y ciencias genómicas que nos permite determinar simultáneamente, los genes de un organismo que se están expresando o suprimiendo ante una condición determinada. Un chip de ADN consiste básicamente en la impresión de todo el genoma de un organismo sobre una placa de vidrio previamente recubierta con grupo amino, aldehído o epóxidos que permitan fijar al ADN de manera covalente en esta superficie. A la cual se adicionará una sonda derivada de la purificación y concentración del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del organismo estudiado (por métodos estándar) y posteriormente un marcaje o etiqueta (sonda). Para crear el marcaje, se realiza una síntesis *in vitro* de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) de cadena sencilla, en la cual se agregan los deoxinucleótidos A, C, G y T más una proporción de deoxinucleótidos T marcado con un fluorocromo. A esta mezcla se agrega una transcriptasa inversa que sintetiza el ADNc a partir del RNAm de nuestro organismo, incorporando el deoxinucleótido T marcado en dos reacciones estándar. Finalmente, el ADNc marcado se purifica para eliminar el deoxinucleótido fluorescente no incorporado al ADNc. De esta forma ya se tiene la sonda marcada para realizar la hibridación con el chip de DNA y su posterior análisis mediante fluorescencia.

Para este experimento se realizó el análisis de Microarreglos de RAW incubadas con 75 μM de NPs de PET durante 48h y con su respectivo control.

2.3.6.1 Preparación de muestra

Los macrófagos RAW 264.7 fueron cultivados y mantenidos en placas Petri de 10 cm hasta alcanzar 80% de confluencia. Las células fueron desprendidas de la placa de cultivo celular mediante espátula estéril, resuspendidas en tubo Falcón, centrifugadas, contadas y sembradas en dos placas de cultivo (5×10^6 células), para ser incubadas durante toda la noche a 37°C a 5% CO₂. Pasado este tiempo se realizó con cambio de medio retirando el anterior y agregando 15mL de medio de cultivo. A una de las placas se le agregó una solución de 1% de NPs de PET (75 μM) y se dejaron incubar por 48 horas a 37°C a 5% CO₂.

2.3.6.2 Aislamiento de ARNm

Para realizar el aislamiento de ARNm se utilizó el siguiente protocolo de SIGMA-ALDRICH(SIGMA-ALDRICH, 1997). Pasado las 48 horas se retiró el medio de cultivo, se lavó con buffer de fosfatos (PBS 1X) con pH 7.4 y se agregó 1 mL de TRI Reagent, un reactivo que permite eficazmente el aislamiento del ARN, ADN y proteínas, se homogeneizó vigorosamente durante 15 segundos y se recuperó en un eppendorf. Se dejó 5 minutos incubando a temperatura ambiente (TA), para luego adicionar 0.2 mL de cloroformo y mezclarse vigorosamente utilizando un vortex. Luego se dejó incubar por 15 minutos a TA. Se centrifugó a 12,000 g por 15 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante (que contiene solamente el ARN) a un eppendorff de 0.5mL para luego agregar 0.5mL de isopropanol y homogeneizar. Luego de 10 minutos se centrifugó a 12,000 g durante 10 minutos a 4°C. Pasado este tiempo se retiró el sobrenadante y se adicionó 1 mL de 75% de etanol, se mezcló vigorosamente mediante vortex para luego ser centrifugado a 7,500 g durante 5 minutos a 4°C. Se dejó reposar durante 30 minutos, se agregó 0.1% de dietil pirocarbonato (DEPC), para reducir el riesgo de que el ARN sea degradado por RNAsas, con un volumen final de 30 μ L y se homogeneizó. Por último, se calentó a 60°C por 15 minutos y se midió la concentración de ARN con un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop modelo 2000/2000c a 260/280 nm.

La muestra de ARN se preparó para ser transportada al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para los subsecuentes experimentos de la siguiente forma. Se lavó la muestra con 50 μ L con agua/DEPC, 5 μ L de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y se mezcló perfectamente en vortex. Se agregaron 138 μ L de etanol 100% frío (-20°C) y se mezcló por inversión hasta la homogeneización. Las muestras se conservaron a -70°C por una noche, antes de ser enviadas, las muestras se centrifugan en una microcentrífuga a máxima velocidad por 15 min. Sin retirar el sobrenadante, se sellaron los tubos con parafilm a fin de evitar que se perdiera líquido y de esta forma se transportaron a temperatura ambiente sin riesgo de degradación del ARN.

2.3.6.3 Hibridización y análisis de microarreglos

Este análisis se realizó en el servicio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Para lo cual se utilizó un chip de Microarreglo M22K_11_12 y se realizó la síntesis de ADNc utilizando los fluoróforos para la muestra con tratamiento Alexa 647 y Alexa555 para el control utilizando el esquema de la Figura 13. El resultado de la cuantificación de las imágenes se analizó mediante Genarise y RStudio, se reportó la calidad

de los Microarreglos mediante una gráfica cruzada de logaritmos y un mapeo de calor que ilustra los genes regulados y la jerarquía con relación a su intensidad utilizando la paquetería “heatmap.2”.

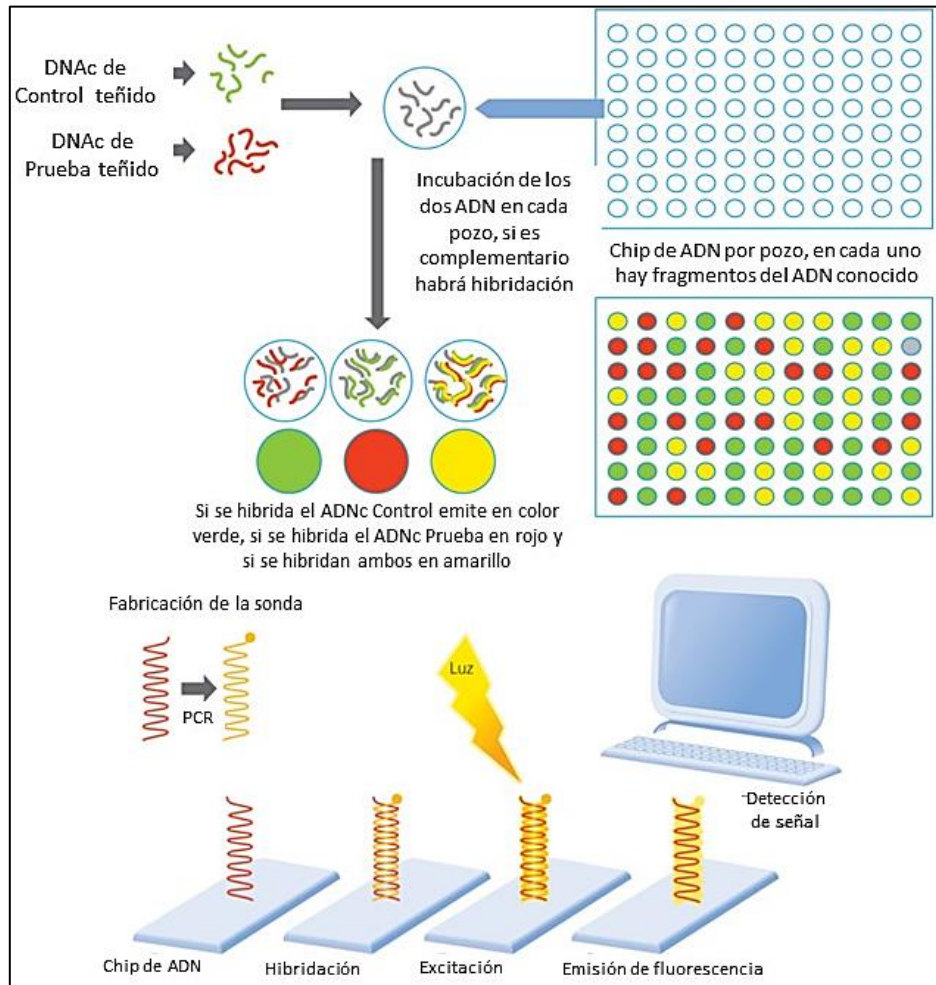


Figura 13. Esquema representativo de la creación de un chip de ADN o Microarreglo (Nature Education, 2014).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización de las NPs de PET

3.1.1 Análisis de NPs mediante DLS

La distribución de tamaños de las NPs de PET obtenidas mediante dilución por ácido se encuentra ilustradas en la Figura 14, y demuestra una distribución de 50 a 250 nanómetros con la presencia de picos representativos en 80 y 200 nanómetros, además de aparentes agregados entre 300 y 500 nanómetros.

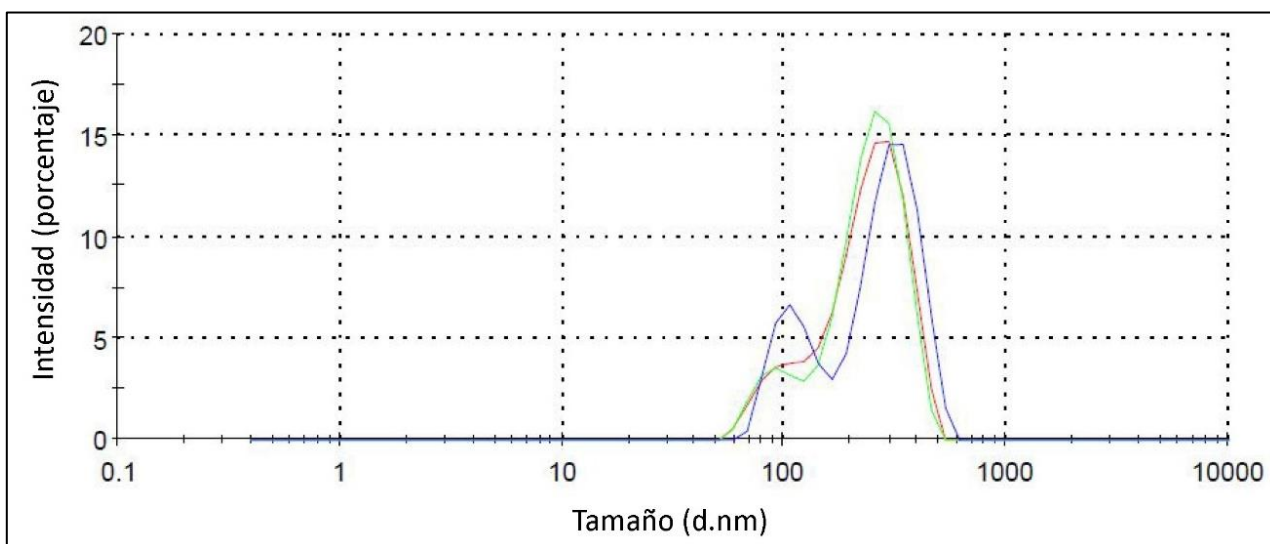


Figura 14. Distribución de volumen de NPs de PET mediante Dispersión Dinámica de Luz, realizado por triplicado.

3.1.2 Análisis de NPs mediante TEM

Las micrografías obtenidas mediante TEM de las NPs de PET se encuentran ilustradas en la Figura 15 y demuestra que las nanopartículas se encuentran aglomeradas. Sin embargo, al ampliar la magnificación se distinguen pequeñas estructuras alrededor de los cúmulos con morfología diversa y tamaños dentro de la nanoescala que se había determinado mediante la dispersión dinámica de luz. Además, al ampliar la magnificación en el área de las estructuras se pueden observar los patrones de difracción característicos de los cristales de PET. La distancia entre los planos calculada mediante ImageJ es de 0.34 nm.

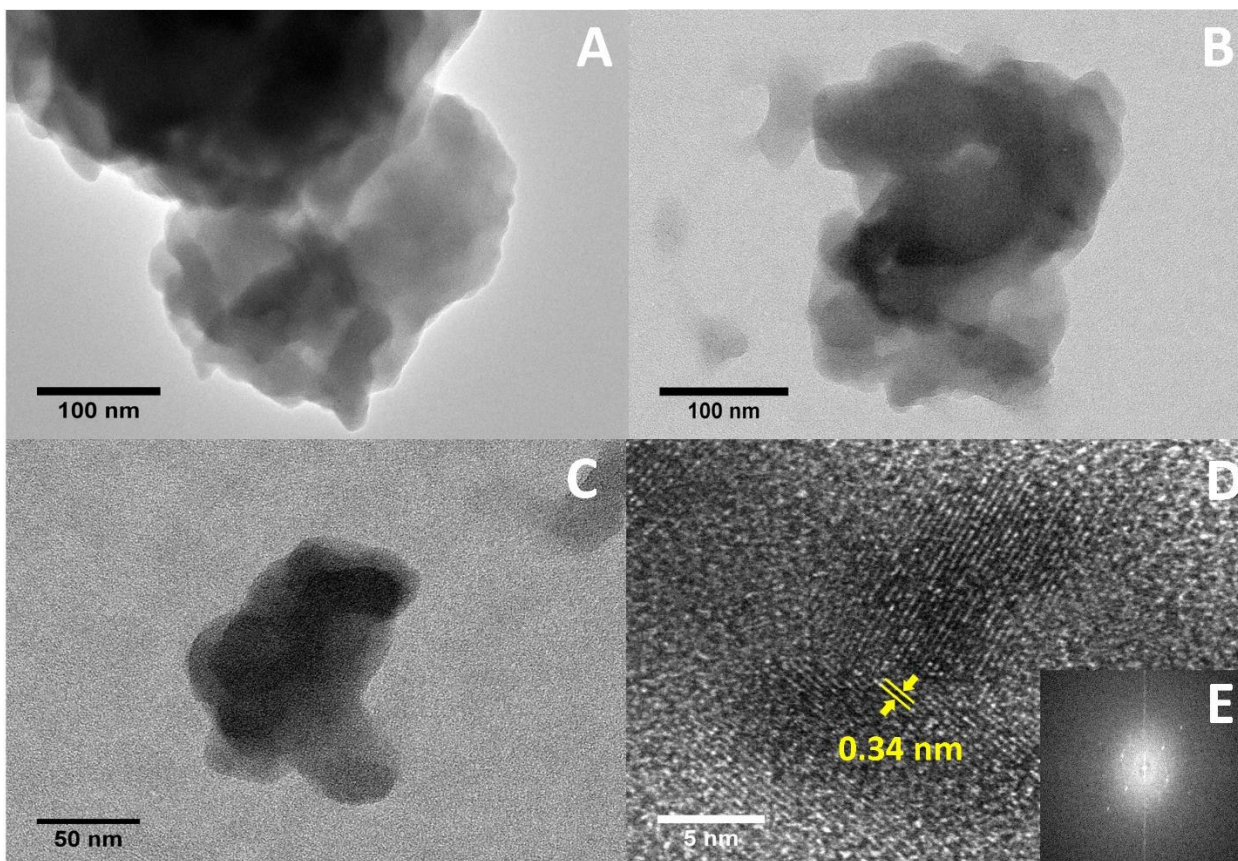


Figura 15. Micrografías obtenidas mediante TEM de NPs de PET a diferentes magnificaciones (A, B, C y D), con flechas amarillas se muestra la distancia interplanar del polímero semicristalino (D) y su respectivo patrón de difracción mediante FTT (E).

3.1.3 Análisis de NPs mediante FTIR

Los espectros obtenidos mediante FTIR se encuentran ilustrados en la Figura 16, en ella, se observan las bandas de absorción del carbonilo a 1714 cm^{-1} correspondiente la vibración de estiramiento de C=O y a un doblete cerca de 1100 cm^{-1} debido probablemente al estiramiento del enlace C-O y a otras vibraciones como O=C-O-C que son una característica espectral importante influenciada por el estado semicristalino del polímero y las fuertes bandas de absorción a 1244 cm^{-1} se deben al estiramiento de C(=O)O y la flexión del plano C-O (Donelli et al., 2009). El pico a 1408 cm^{-1} podría asignarse a vibraciones de estiramiento esquelético aromático y los picos 870 y 723 cm^{-1} a un grupo de bencenos fuera del plano (Fávaro et al., 2007; Ozaltin et al., 2019). Por último, las bandas 1339 y 1019 cm^{-1} pueden ser atribuidas al movimiento de CH_2 correspondientes a fragmentos de polietilen glicol (Donelli et al., 2009).

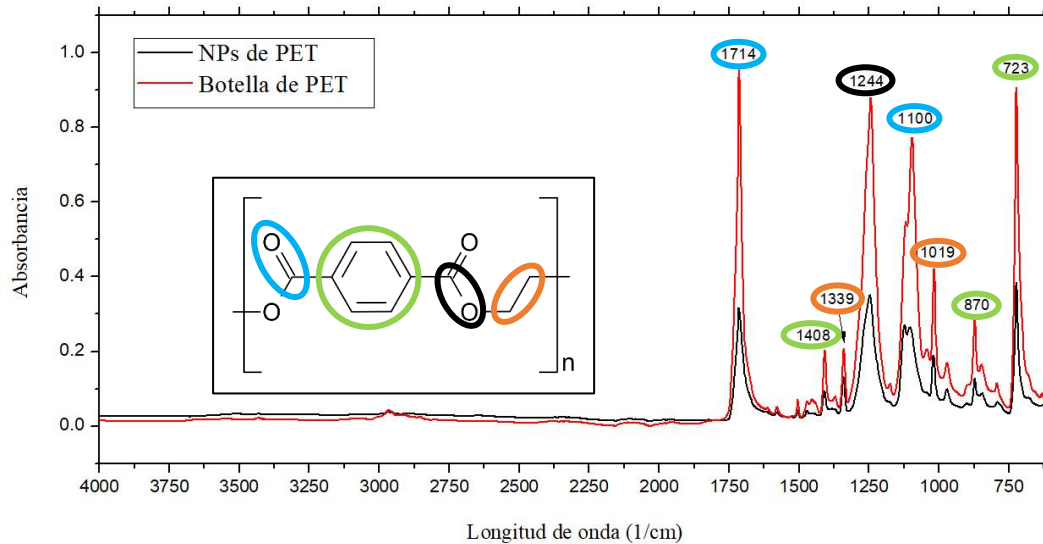


Figura 16. Espectro de absorbancia FTIR de NPs de PET y una placa de PET extraída de una botella de plástico comercial.

Los resultados indican que al preparar NPs de PET mediante la dilución por ácido trifluoroacético se mantiene la estructura molecular del tereftalato de polietileno debido a que en ambas muestras se pueden apreciar las bandas de estiramiento características del material.

3.1.3 Análisis de NPs mediante XRD

El patrón de difracción de las NPs de PET obtenido mediante difracción de rayos-X se encuentran ilustrado en la Figura 17 y demuestra las máximas intensidades de las bandas amorfas y las curvas de difracción de los planos reflexión cristalino 100, 010 y 110. Esto es asumido como suficientemente representativo en correspondencia con el área asociada a los picos que se observan en los trabajos investigación de James E. Johnson para el estudio cristalográfico del PET (código de referencia 00-060-0989), resumidos en la Tabla 5 (Johnson, 1959).

Tabla 5. Parámetros cristalográficos del PET.

No.	h	k	l	d [Å]	2θ [°]	I [%]
1	0	-1	1	5.48480	16.147	77.0
2	0	1	0	5.08792	17.416	79.0
3	-1	0	2	4.10854	21.612	65.0
4	-1	0	1	4.10854	21.612	65.0
5	1	-1	0	3.91044	22.721	85.0
6	-1	0	3	3.42576	25.989	100.0
7	1	0	0	3.42576	25.989	100.0
8	1	-1	1	3.21706	27.707	39.0
9	0	-2	1	2.75003	32.533	17.0
10	1	1	-3	2.75003	32.533	17.0
11	1	0	-5	2.13134	42.374	17.0
12	2	0	-4	2.04558	44.242	8.0
13	1	2	-2	1.94585	46.640	11.0

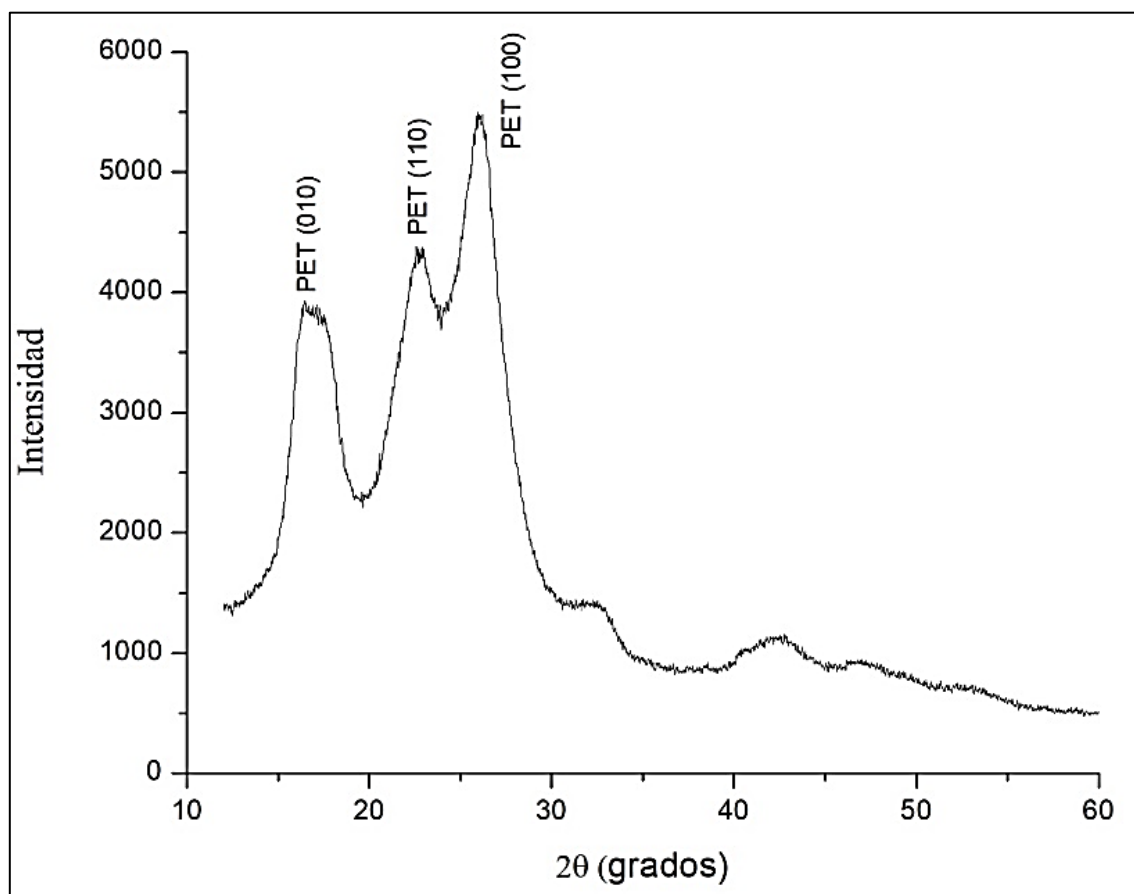


Figura 17. Patrón de difracción de NPs de PET.

3.2 Resultados de la evaluación de la toxicidad de NPs de PET

3.2.1 Viabilidad y proliferación celular de los macrófagos al interactuar con NPs de PET

Los efectos en la viabilidad de los macrófagos de ratón en contacto con diversas concentraciones de NPs de PET, se encuentran ilustradas en la Figura 18. Se destaca que el control de nanopartículas solas “NPsPET” no produce fluorescencia en ningún momento por lo que no influye en la medición.

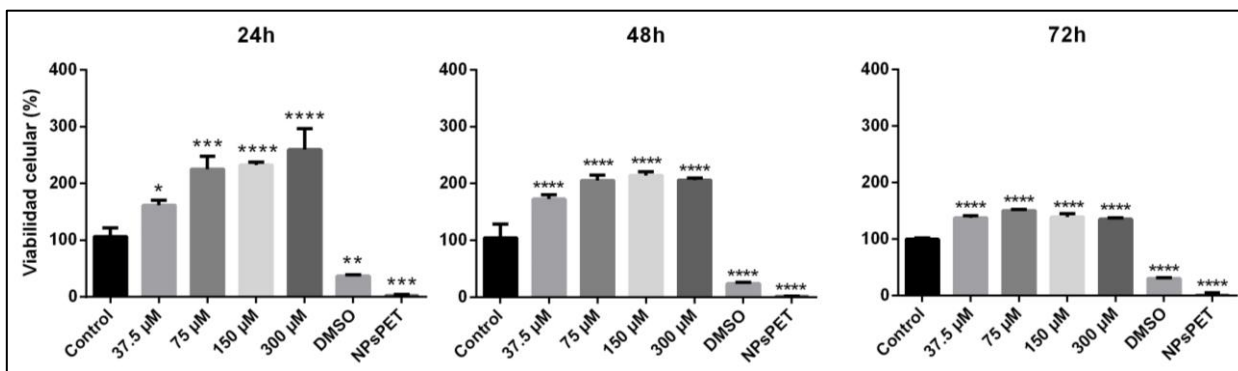


Figura 18. Viabilidad celular de la línea celular RAW 264.7 en presencia de diferentes concentraciones de NPs de PET. La información tiene una desviación estándar promedio (SD) $n = 3$. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de una vía; en dónde, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ es diferente significativamente respecto al control de medición.

En la Figura 18 correspondiente a la viabilidad y proliferación celular de la línea celular RAW se puede observar que, desde las 24 h existe un aumento drástico en la viabilidad en todas las concentraciones que va disminuyendo conforme pasa el tiempo, sin embargo, las concentraciones se mantienen por arriba del control a las 72 h.

3.2.2 Identificación de especies reactivas de oxígeno mediante espectrometría de fluorescencia

La presencia de ROS de las líneas celulares RAW 264.7 en contacto con diversas concentraciones de NPs de PET, obtenidas mediante Espectrometría de fluorescencia, se encuentran ilustradas en la Figura 22.

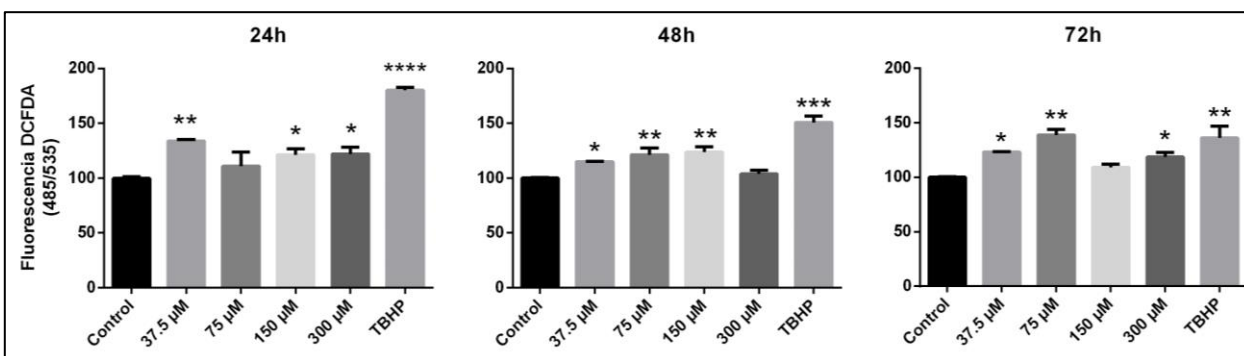


Figura 19. Producción de ROS de la línea celular RAW 264.7 en presencia de diferentes concentraciones de NPs de PET mediante espectroscopía de fluorescencia del fluoróforo DCFDA. La información tiene una desviación estándar promedio (SD) $n = 3$. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de una vía; en dónde, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ y $****p < 0.0001$ es diferente significativamente respecto al control de TBHP.

En la Figura 19 correspondiente a la producción de ROS en la línea celular RAW 264.7, se puede observar que existe un ligero aumento de la producción de ROS a las 24 horas en las concentraciones de 300 μM , 150 μM y 37.5 μM . Mientras que a las 48 horas se observa el aumento de las ROS en las concentraciones de 150 μM , 75 μM y 37.5 μM . Y finalmente a las 72 horas se observa el aumento de las ROS en las concentraciones de 300 μM , 75 μM y 37.5 μM .

3.2.3 Dirección de especies reactivas de oxígeno mediante microscopía confocal

Con base a los resultados anteriores y a las concentraciones utilizadas en otros trabajos, se decidieron realizar los demás experimentos con la concentración de 75 μM de NPs de PET.

La presencia de ROS de las líneas celulares RAW en contacto con 75 μM de NPs de PET, obtenidas mediante microscopía confocal, se encuentran ilustradas en la Figura 23.

En la Figura 20 correspondiente a la producción de ROS en la línea celular RAW 264.7 se puede observar que, se destaca la presencia marcada de ROS en los controles de esta línea celular. En el caso de las micrografías de las pruebas se observa que a las 24 horas existe la presencia NPs de PET (Rojo) a un lado de los núcleos de las células (azul), lo que corresponde a su internalización. Conforme pasa el tiempo, a las 48 horas y 72 horas, se observa la presencia más marcada de las ROS alrededor de las NPs de PET (verde y amarillo).

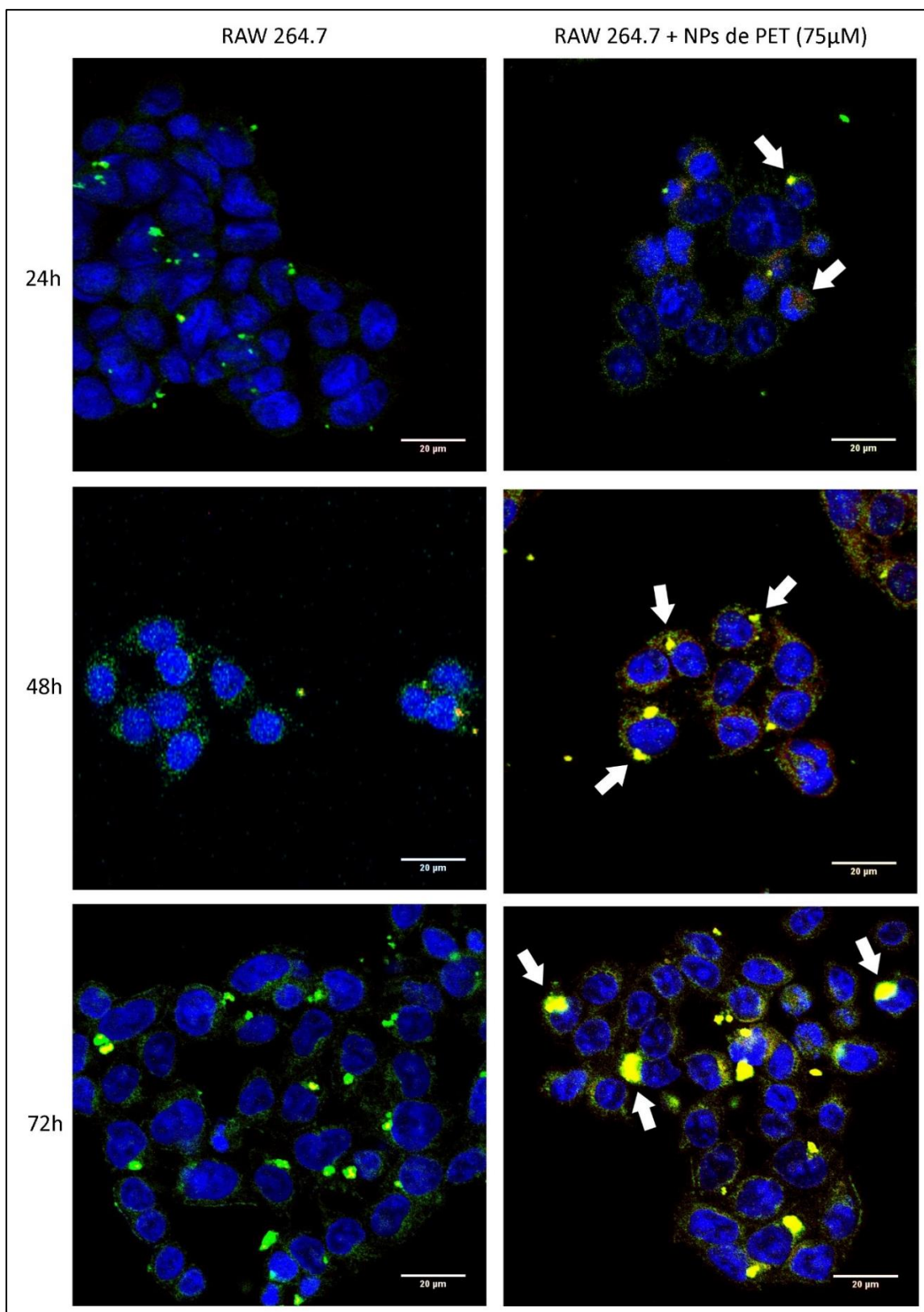


Figura 20. Producción de ROS de la línea celular RAW 264.7 presencia de NPs de PET (75 µM) mediante microscopía confocal. En azul DAPI, en verde DCFDA y en rojo NPs de PET. Se señalan con flecha cúmulos amarillos producto del solapamiento de la señal verde y la roja.

3.2.4 Internalización de NPs de PET en macrófagos mediante TEM

La interacción de los macrófagos con las NPs de PET se encuentra ilustrada en la Figura 22, se puede observar que, la principal diferencia entre las células control y las prueba es la presencia de zonas con mayor electrodensidad adheridas a la membrana de las endosomas. No se observa necrosis ni daños generales en las células, pero sí el incremento de vesículas con formas poco geométricas e indefinidas.

Para demostrar que las partículas observadas son realmente NPs de PET se comparó la distancia entre los planos cristalinicos de la micrografía de la Figura 21D y la distancia entre los planos de las NPs obtenidas en la preparación por ácido, mediante una Transformada de Fourier Rápida (FFT), recuadro en la Figura 21-E. Utilizando el software ImageJ y la función FFT, se determinó que la distancia entre los planos atómicos coincide en 0.34 nm. Al someter esta distancia interpelaran a la ecuación de Bragg (Ecuación 2) obtenemos un 2θ de 26.24, esto corresponde con el pico máximo del patrón de refracción del PET en la caracterización mediante XRD. De esta forma demostramos completamente la presencia de NPs de PET dentro de la línea celular RAW.

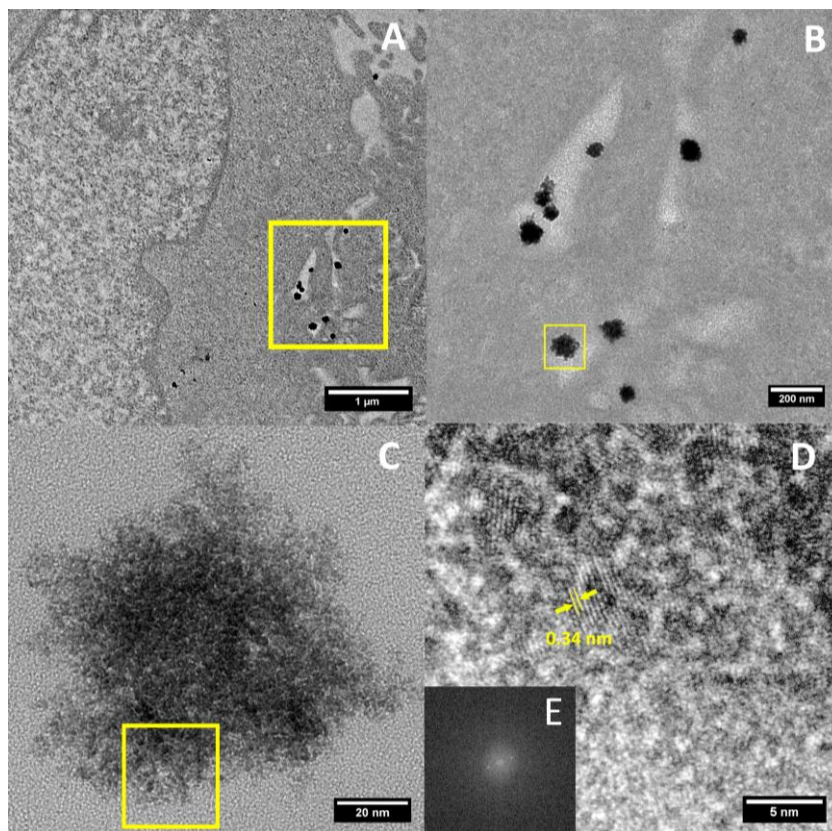


Figura 21. Secuencia de micrografías a distintas magnificaciones de NPs de PET internalizadas por la línea celular RAW (A, B, C y D), con flechas amarillas se muestra la distancia inter planar del PET semicristalino (D) y su respectivo patrón de difracción mediante FFT (E).

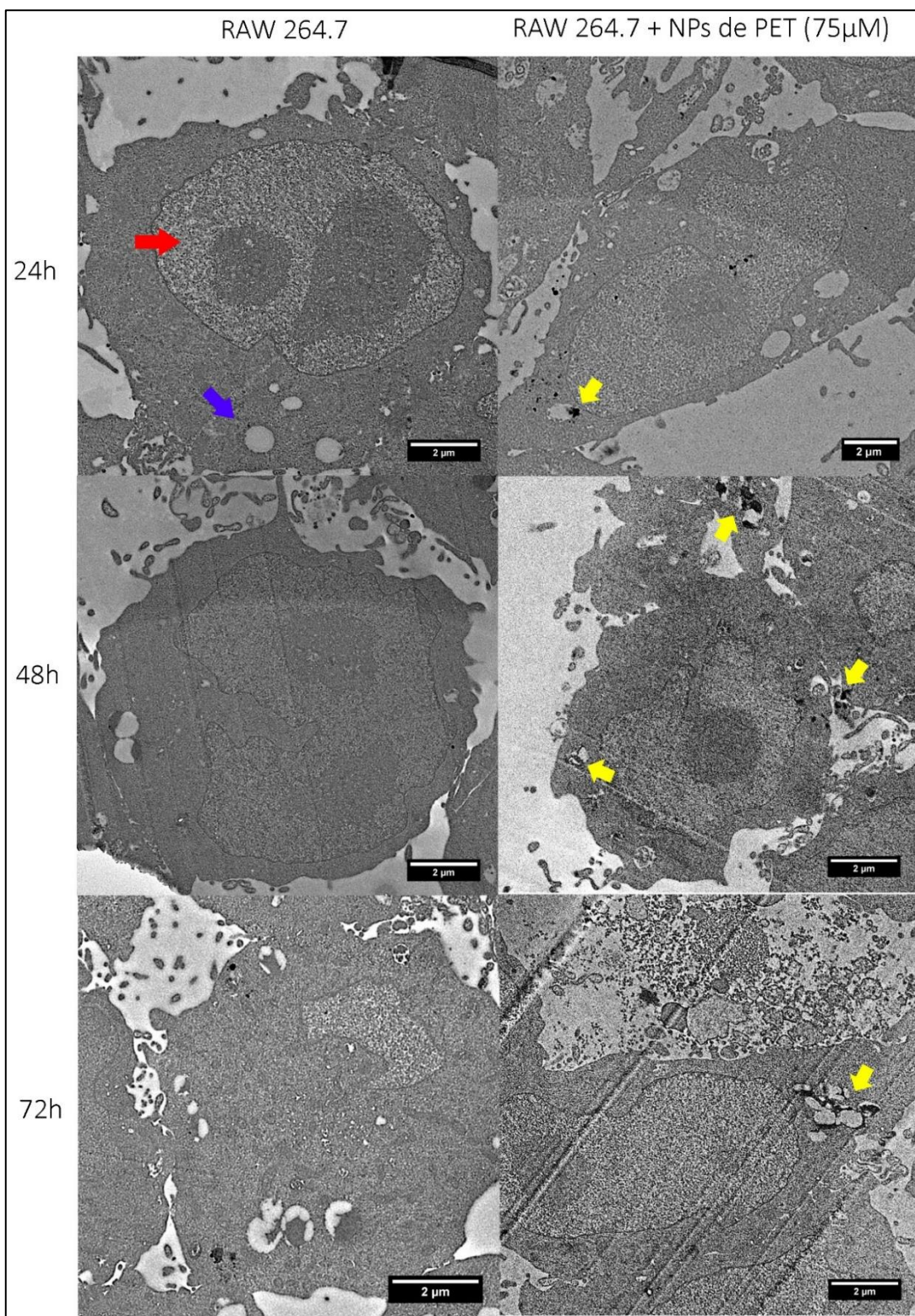


Figura 22. Micrografía de macrófagos de ratón incubados con una concentración de 75 µM de NPs de PET durante 24, 48 y 72 horas. La flecha roja apunta al núcleo celular que envuelve al nucleolo, la flecha azul apunta a una endosoma convencional y las flechas amarillas indican la presencia de NPs dentro de los endosomas. La muestra presenta ligeros rayones debido a la cuchilla del microtomo.

3.2.5 Análisis de la alteración de expresión genética en macrófagos mediante chips de Microarreglos

La relación entre las señales de fluorescencia del chip de Microarreglos de nuestra muestra control y la interacción de la línea celular RAW 264.7 con 75 μM de NPs de PET se encuentra ilustrada en la Figura 23. Se observa que las señales se ajustan casi por completo, lo que indica un buen marcado, hibridación y lectura.

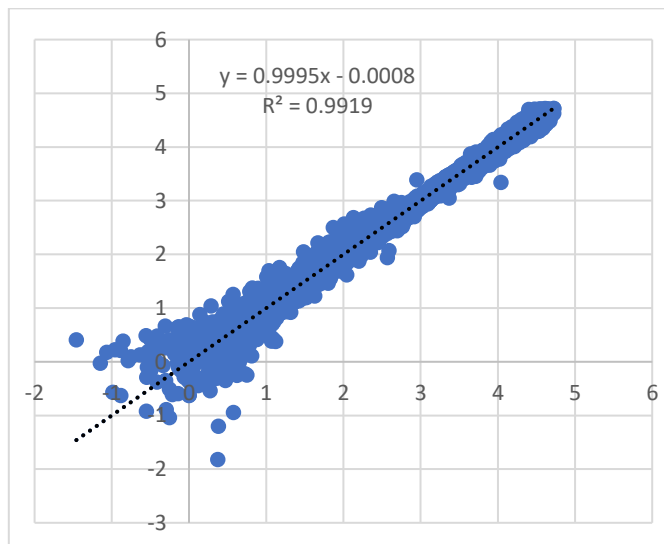


Figura 23. Grafica del logaritmo de la señal control X contra la señal del tratamiento con NPs de PET eje Y. Ambas señales se ajustan a una recta con un coeficiente de 0.9919.

La expresión genética producto de la asociación entre las señales de fluorescencia de nuestro control y la que interacciona de la línea celular RAW 264.7 con 75 μM de NPs de PET, se encuentra ilustrada en el mapa de calor de la Figura 24. La intensidad de las señales nos permite realizar un mapeo de jerarquías para explotar las posibles rutas metabólicas activadas o desactivadas luego de someter a esta línea celular a la interacción con las NPs de PET.

La descripción de los genes seleccionados en el chip de Microarreglos se encuentran ilustrados en la Tabla 5. De manera general podemos ver genes implicados en la regulación de la respuesta inmunológica, quimiotaxis, crecimiento, proliferación, apoptosis, además de genes que codifican a proteínas encargadas de la degradación de materiales exógenos.

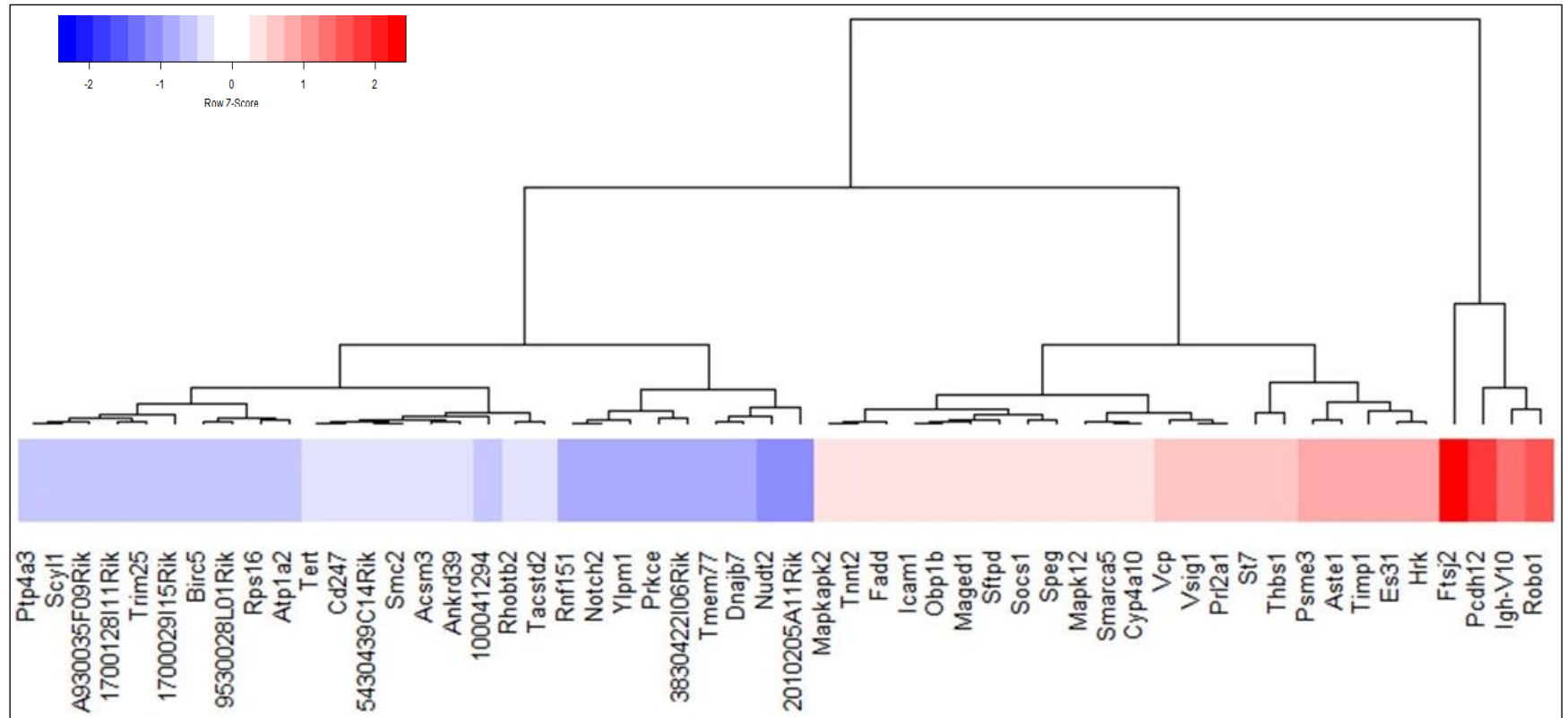


Figura 24. Mapeo de calor de la expresión genética de la línea celular RAW al ser expuesta a 75 µM de NPs de PET. En rojo se encuentra la cuantificación de los genes sobrerregulados y en azul los genes infrarregulados.

Tabla 6. Expresión de genes regulados obtenidos al analizar el efecto de las NPs de PET en macrófagos.

Genes Infrarregulados			
Símbolo	Nombre original	Descripción	Referencias
Dnajb7	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 7	<ul style="list-style-type: none"> Chaperona miembro de la super familia de las proteínas de choque térmico (Heat Shock) Estabiliza la interacción del ATP con las enzimas Hsp70s 	(Qiu et al., 2006)
Tmem77/Dram2	transmembrane protein 77	<ul style="list-style-type: none"> Proteína que contribuye en la inducción de la autofagia. 	(Yoone et al., 2012)
Prkce	Protein kinase C Epsilon	<ul style="list-style-type: none"> Proteína involucrada en la activación y defensa ante infecciones bacterianas 	(Castrillo et al., 2001)
Ylpm1	YLP motif containing 1	<ul style="list-style-type: none"> Reducción de la actividad de la telomerasa durante la diferenciación mediante la unión al promotor central de TERT y el control de su baja regulación Crecimiento y mortalidad 	(Cornman, 2010)
Notch2	Notch gene homolog 2	<ul style="list-style-type: none"> Proteínas receptoras que permiten la señalización entre células 	(Gridley, 2010)
Rnf151	ring finger protein 151	<ul style="list-style-type: none"> Normalmente funcionan como módulos de interacción que unen el ADN, ARN, proteínas y moléculas pequeñas Estas proteínas tienen un rol estructural esencialmente 	(Nian et al., 2007)
Atp1a2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide	<ul style="list-style-type: none"> Enzima ATPasa que regula estableciendo o manteniendo el paso de los iones de potasio y sodio a través de la membrana celular 	(De Fusco et al., 2003)
Rps16	ribosomal protein S16	<ul style="list-style-type: none"> Parte estructural de los ribosomas mitocondriales 	(Chan et al., 1990)
Birc5	baculoviral IAP repeat-containing 5	<ul style="list-style-type: none"> Proteína encargada de la regulación de la división y proliferación 	(Dubrez et al., 2008; Lens et al., 2006)
Trim25	tripartite motif-containing 25	<ul style="list-style-type: none"> Permite la ubiquitinación de las caspasas y tiene un rol principal ante infecciones virales 	(Gack et al., 2007)
Scyl1	SCY1-like 1	<ul style="list-style-type: none"> Es una cinasa catalíticamente inactiva que produce tubulaciones en el retículo endoplásmico y <i>cis</i>Golgi 	(Hamlin et al., 2014)
Ptp4a3	protein tyrosine phosphatase 4a3	<ul style="list-style-type: none"> Proteína tirosina fosfatasa que modula los niveles de TNF-alfa y el shock endotóxico 	(Tang et al., 2009)
Tert	telomerase reverse transcriptase	<ul style="list-style-type: none"> Subunidad catalítica de la enzima telomerasa 	(Autexier y Lue, 2006)
Cd247	CD247 antigen	<ul style="list-style-type: none"> Proteína adaptadora de señalización transmembrana 	(Boudin y Louveau, 2015)
Smc2	structural maintenance of chromosomes 2	<ul style="list-style-type: none"> Componente central del complejo de condensina. 	(Kimura et al., 2001)
Acsm3	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3	<ul style="list-style-type: none"> Participa en el primer paso del metabolismo de los ácidos grasos 	(Ruan et al., 2017)
Ankrd39	ankyrin repeat domain 39	<ul style="list-style-type: none"> Median la unión de proteínas integrales de membrana al citoesqueleto de membrana basado en espectrina-actina 	(Bennett y Baines, 2001)

Rhobtb2	Rho-related BTB domain containing 2	<ul style="list-style-type: none"> Es un sustrato para un complejo de ubiquitina ligasa basado en Cul3 	(Wilkinse et al., 2004)
Tacstd2	tumor-associated calcium signal transducer 2	<ul style="list-style-type: none"> Proteína afecta la función de barrera epitelial al unirse fuertemente 	(Nakatsukasa et al., 2010)
Genes sobrerregulados			
Símbolo	Nombre original	Descripción	Referencias
Ftsj2	FtsJ homolog 2	<ul style="list-style-type: none"> Proteína "Heat shock" implicada en el crecimiento celular ante respuesta a estrés 	(Bügl et al., 2000)
Robo1	roundabout homolog 1	<ul style="list-style-type: none"> receptor transmembrana de un solo paso que desempeña un papel en la regulación de la migración celular y la quimiotaxis de células T 	(Prasad et al., 2007)
Igh-V10	immunoglobulin heavy chain (V10 family)	<ul style="list-style-type: none"> Proteína plasmática sintetizada en respuesta a la estimulación por un antígeno, y que actúa como anticuerpo 	(Williams, 1998)
Pcdh12	protocadherin 12	<ul style="list-style-type: none"> Molécula de adhesión homofílica 	(Tanihara et al., 1994)
Hrk	harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)	<ul style="list-style-type: none"> Regulador de muerte celular 	(Inohara et al., 1997)
Es31	esterase 31	<ul style="list-style-type: none"> Participa en la desintoxicación de xenobióticos, como la hidrólisis de ésteres y amidas 	(Aida et al., 1993)
Timp1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	<ul style="list-style-type: none"> Inhibición de metaloproteasas 	(Coulombe et al., 1992)
Aste1	asteroid homolog 1	<ul style="list-style-type: none"> Posible papel en la señalización del receptor de EGF 	(Kotarski et al., 1998)
Psme3	proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, 3	<ul style="list-style-type: none"> Complejo activador de proteasoma subunidad 3 	(Gomes et al., 2006)
Thbs1	thrombospondin 1	<ul style="list-style-type: none"> Ligando para CD36 que media las propiedades antiangiogénicas (por similitud). Desempeña un papel en la respuesta al estrés ER, a través de su interacción con el factor de transcripción activador 6 alfa (ATF6) que produce factores adaptativos de respuesta al estrés del RE 	(Sunderkotter et al., 1994)
St7	suppression of tumorigenicity 7	<ul style="list-style-type: none"> Organización de la matriz extracelular y regulación de la diferenciación celular 	(NCBI, 2020)
Prl2a1	prolactin family 2, subfamily a, member 1	<ul style="list-style-type: none"> Pertenece a la familia somatotropina / prolactina 	(KEGG, 2020)
Vsig1	V-set and immunoglobulin domain containing 1	<ul style="list-style-type: none"> Posibles funciones supresoras de tumores 	(Inoue et al., 2017)
Vcp	valosin containing protein	<ul style="list-style-type: none"> ATPasa del retículo endoplásmico de transición Implicado en la formación del retículo endoplásmico rugoso. Presente en eventos relacionados con la ubiquitina. 	(Guem et al., 2013)
Cyp4a10	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 10	<ul style="list-style-type: none"> La subfamilia cataliza la oxidación de una amplia variedad de sustratos, incluidos los lípidos endógenos y los xenobióticos. 	(Zhang y Klaassen, 2013)

Smarca5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5	<ul style="list-style-type: none"> • Helicasa que posee actividad intrínseca de remodelación de nucleosomas dependiente de ATP 	(Strohner et al., 2001)
Mapk12	mitogen-activated protein kinase 12	<ul style="list-style-type: none"> • Respuestas celulares provocadas por estímulos extracelulares como las citocinas proinflamatorias 	(Pearson et al., 2001)
Speg	SPEG complex locus	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad de cinasa serina / treonina 	(X. Gu, 2016)
Socs1	suppressor of cytokine signaling 1	<ul style="list-style-type: none"> • Está involucrado en la regulación negativa de las citocinas que señalizan a través de la vía JAK / STAT3 	(X. Gu, 2016)
Sftpd	surfactant associated protein D	<ul style="list-style-type: none"> • Interactúa con compuestos como lipopolisacáridos bacterianos, oligosacáridos y ácidos grasos y modula la acción de los leucocitos en la respuesta inmune 	(Holmskov et al., 1999)
Maged1	melanoma antigen, family D, 1	<ul style="list-style-type: none"> • Puede aumentar la actividad de ubiquitina ligasa de las ligasas de proteína de ubiquitina E3 de tipo RING que contienen dedos de zinc 	(Rolland et al., 2014)
Obp1b	odorant binding protein 1b	<ul style="list-style-type: none"> • Se une al odorante químico 2-isobutil-3-metoxipirazina 	(Pes y Pelosi, 1995)
Icam1	intercellular adhesion molecule 1	<ul style="list-style-type: none"> • Ligandos para la proteína de adhesión leucocitaria LFA-1 (integrina alfa-L / beta-2) • Durante la migración transendotelial de leucocitos, el compromiso ICAM1 promueve el ensamblaje de copas apicales endoteliales a través de la activación ARHGGEF26 / SGEF y RHOG 	(Hayashi et al., 2001)
Fadd	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	<ul style="list-style-type: none"> • Molécula adaptadora apoptótica que recluta caspasa-8 o caspasa-10 a los receptores Fas (CD95) o TNFR-1 activados. • El agregado resultante llamado complejo de señalización inductor de muerte (DISC) realiza la activación proteolítica de caspasa-8. • La caspasa-8 activa inicia la cascada posterior de caspasas que median la apoptosis 	(Galluzzi et al., 2008)
Tnnt2	troponin T2, cardiac	<ul style="list-style-type: none"> • La troponina T es la subunidad de la troponina que se une a la tropomiosina, el complejo regulador de filamentos delgados que confiere sensibilidad al calcio a la actividad ATPasa de actomiosina del músculo estriado 	(Sumandea et al., 2003)
Mapkapk2	MAP kinase-activated protein kinase 2	<ul style="list-style-type: none"> • Respuestas celulares provocadas por estímulos extracelulares como las citocinas proinflamatorias 	(Pearson et al., 2001)

Capítulo 4. Discusión

4.1 Preparación y caracterización de NPs de PET mediante hidrólisis ácida

La preparación de las NPs de PET implicó la puesta a punto de un procedimiento fisicoquímico preciso en el cual fuera posible la fragmentación de MPs de PET en NPs de PET. Para esto se aprovechó la característica física de la policristalinidad del PET, pequeños cristales entrelazados por fibras amorfas poliméricas, y la alta electronegatividad del grupo trifluorometilo del TFA a la temperatura estable de 50° para realizar una degradación del material mediante hidrólisis ácida (Demirel et al., 2011). La parte clave es el pequeño choque térmico que se genera al agregar TFA en menor concentración y el movimiento constante de la barra magnética lo que forma burbujas con la suficiente temperatura para que al reaccionar, les proporcionen la energía suficiente a las fibras amorfas para separarse, realizar una reacción de transferencia intermolecular y fragmentar a las MPs de PET en NPs de PET. Esto es posible tomando en cuenta que las reacciones de transferencia intramolecular son comunes en la síntesis primaria del PET, en la degradación por métodos térmicos de polímeros orgánicos y en el reciclaje (Al-Sabagh et al., 2016; Bandyopadhyay et al., 2015; Holland & Hay, 2002). El mecanismo de reacción propuesto para la preparación de NPs de PET mediante hidrólisis por ácido se encuentra ilustrado en el Anexo 1.

La predicción de la distribución de tamaño de partícula obtenido por el diámetro hidrodinámico (80 a 200 nm) en la DLS, se confirmó mediante las micrografías obtenidas mediante HRTEM. Dentro de estas proyecciones se encuentra una gran variedad de tamaños, formas y aglomerados de NPs de PET las cuales se deben probablemente a la hidrólisis no selectiva causada por el ácido y a la proporción tan baja de cristalización del material. En el caso de las botellas de PET convencionales utilizadas para almacenamiento de bebidas el porcentaje de cristalinidad varía entre 24 y 33 %, esto permite que la degradación debido a la hidrólisis por ácido permita obtener nanopartículas tan pequeñas (Taub y Singh, 1997). Los espectros obtenidos mediante FTIR, XRD y los patrones de difracción electrónica obtenidos mediante TEM corroboraron la estabilidad de la química del material al preparar las NPs de PET comparado con la literatura (Demirel et al., 2011; Johnson, 1959; Rodríguez-Hernández et al., 2019; The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2018).

4.2 Análisis *in vitro*

Al igual que en la mayoría de los estudios relacionados con MPs/NPs de plástico a bajas concentraciones, existe la consistencia de poca o nula toxicidad de las NPs de PET en estudios *in vitro*, incluso se puede observar un aumento en la actividad metabólica de varias líneas celulares (Hwang et al., 2019; Lim et al., 2019; Magrì et al., 2018; Rodríguez-Hernández et al., 2019; Schirinzi et al., 2017; Wu et al., 2019). Al observar el aumento drástico la actividad de la NADH deshidrogenasa al ser estimulada por las NPs de PET y luego su disminución conforme pasaba el tiempo sugiere que de alguna forma las NPs de PET pueden ser acarreadores de nutrientes que aumentan la viabilidad, pero luego interfieren con el desarrollo de las células y comprometen su salud, cosa que se corrobora con los siguientes ensayos.

En el caso del análisis de la producción de ROS mediante espectroscopía de fluorescencia y microscopía confocal utilizando la concentración de 75 μM de NPs de PET, se observó el aumento gradual a lo largo del tiempo y esto tiene sentido porque se ha demostrado que la producción de óxido nítrico (NO) inhibe la división celular, lo que confirma la disminución de la proliferación a lo largo del tiempo. Esto tiene más sentido si entendemos que la contraparte del NO es la ornitina, la cual estimula la división celular (por la vía de las poliamidas), esto indica como la activación entre M1 y M2 pueden influenciar en las reacciones inflamatorias en diferentes sentidos, en nuestro caso se observa un aumento rápido en la proliferación, que luego disminuye, este proceso fue explicado por Mills y colaboradores (Mills et al., 2000).

Los análisis por TEM, demuestran la internalización de las NPs de PET mediante fagocitosis. En este caso es posible que las NPs comprometan a las membranas endosomales dentro de las células pues podrían mantenerse adheridas, algo consistente con el trabajo realizado por Magrì y colaboradores (Magrì et al., 2018). Otra posible hipótesis es que las NPs de PET puedan ser acarreadores proteicos, es decir que su superficie sea cercada por una corona proteica la cual puede delimitar su energía de superficie, dándole la capacidad de ser fagocitada y que las proteínas adheridas a la superficie sean metabolizadas en el interior de los endosomas al fusionarse con los lisosomas (Tenzer et al., 2013).

Al realizar una comparación general de todos los análisis *in vitro* nos lleva a pensar que los macrófagos se encuentran en transición hacia la polarización M1 (W. Gu et al., 2017). Para tener una idea más clara que está pasando en las células antes de la caída en su viabilidad a 72 horas, se decidió analizar la expresión genética de los macrófagos al interactuar con NPs de PET 75 μM durante 48 h. De manera general podemos observar una sobreexpresión de transcritos relacionadas con: a) la remodelación de la estructura celular, b) regulación de la proliferación y la apoptosis y c) la respuesta proinflamatoria e inmune; en la cual se integra

la endocitosis, producción de citocinas pro-inflamatorias, receptores de señales, anticuerpos y proteínas lisosomales.

En el caso de la remodelación de la estructura celular observamos que el transcrito más sobreexpresado es *Ftsj2*, una proteína de choque térmico involucrada en el crecimiento celular ante estrés, que probablemente sean generados por las NPs de PET. Otros transcritos íntimamente relacionados o altamente expresados son, *Robo1*, que corresponde con el receptor intermembrana *CXCR4* y el cual interactúa con la ruta de señalización de la proteína *Cdc42* que participa en la quimiotaxis. Podemos ver que el transcrito *Vcp* participa activamente en el metabolismo de lípidos con dirección a la formación de la membrana, indispensable en la quimiotaxis (Guem et al., 2013). Dentro de esta respuesta, también se encuentra la sobre expresión de *St7* y *Aste1*, los cuales juegan un papel muy importante, ya que participan directamente en la remodelación del citoesqueleto de actina (Kotarski et al., 1998; NCBI, 2020), que influye en la remodelación de la cromatina que a su vez permite la formación de pseudópodos (estructuras necesarias para la motilidad celular) (Allen et al., 1998). Este último mecanismo se ve reforzado por la sobre regulación del transcrito *ICAM1*, molécula intracelular con afinidad a integrinas. (W. Gu et al., 2017).

Por otro lado, si nos referimos a la regulación de la proliferación y la apoptosis podemos ver una sobreexpresión de *TIMP-1*, el cual permite codificar para la cascada de señalizaciones encargadas de la degradación de matriz extracelular, supervivencia, inhibición de la apoptosis y proliferación (Coulombe et al., 1992; Fata et al., 1999). Llama la atención la presencia de la sobreexpresión, aunque en menor medida, de los transcritos descritos previamente, *Maged1*, *Hrk* y *Fadd*, reguladores de muerte proapoptóticos; la cual se puede correlacionar con la disminución de la proliferación que se observa en los macrófagos luego de las primeras 24 h de interactuar con las NPs de PET (Galluzzi et al., 2008; Inohara et al., 1997; Rolland et al., 2014).

Al mismo tiempo se destaca la participación del tercer transcrito más sobreexpresado, *Es31*, que participa en la desintoxicación de xenobióticos, como la hidrólisis de amidas y ésteres (Aida et al., 1993). Es importante destacar que estos tipos de enlaces son las uniones características de los monómeros de las NPs de PET (Adam, 2018)

Finalmente, con respecto a la respuesta proinflamatoria e inmune, nuestros resultados sugieren que existe la generación de anticuerpos en respuesta a la estimulación por un antígeno, en este caso las NPs de PET, los cuáles se presentan en el transcrito del fragmento de la inmunoglobulina *IgH-V10* (Williams, 1998).

Al mismo tiempo existe una sobreexpresión de los transcritos *Psme3* y *Thbs1* los cuales participan en la producción de citocinas pro-inflamatorias correspondientes a la polarización M1 de macrófagos (Gomes et al., 2006; Liao et al., 2014). Esto último se ve reforzado, por la sobreexpresión del transcritos *Socs1* y *Speg* (aunque en menor proporción comparado con *Psme3* y *Thbs1*) que permite supresión de las vías de señalización de citocinas proinflamatorias en macrófagos (X. Gu, 2016; Latour et al., 2020). Además, podemos ver una sobreexpresión de las MAPK (de las siglas en inglés Mitogen-Activated Protein Kinases) involucradas en la fagocitosis, la respuesta proinflamatoria, así como la adaptabilidad de las células a su entorno. Las MAPK, parece tener más de una función, ya que a su vez activan a *Psme3* que inhiben la apoptosis y son activados mediante la vía de las TLRs (Krachler et al., 2011; Neish y Naumann, 2011). Todo esto nos lleva a pensar que existe una transición de la polarización de los macrófagos M2 a M1, en donde las NPs de PET estimulan la proliferación de las células, pero conforme pasa el tiempo sucede una transición a la M1 como respuesta a tiempos más largos, en donde la célula se limita a combatir a las NPs de PET, incluso empiezan a sobreregularse transcritos pro apoptóticos.

Capítulo 5. Conclusión

Actualmente el número de aplicaciones de materiales a base de plástico sigue aumentando y con ello, persiste una preocupación a nivel mundial con respecto al posible efecto tóxico, como resultado de la interacción de micro- y nanopartículas de plástico con el medio ambiente y con diferentes organismos. Sin embargo, no existen estudios contundentes que demuestren la toxicidad de las NPs de PET. En la presente investigación, se han logrado preparar y caracterizar exitosamente NPs de PET, además de determinar los posibles efectos de NPs de PET (80 – 250 nm) utilizando un modelo de línea celular de macrófagos de ratón (RAW 264.7). Se han demostrado a grandes rasgos la transición hacia la polarización M1 de macrófagos al interactuar con las NPs de PET en tiempos cortos y a bajas concentraciones, en donde se destaca un aumento de viabilidad que disminuye con el tiempo, el aumento de la producción de ROS, la internalización de las NPs de PET mediante fagocitosis vía TLRs, la producción de citocinas pro-inflamatorias y quimiotaxis en tiempos cortos y una posible activación de la apoptosis en tiempos más largos.

Literatura citada

- Adam, A. 2018. Polyethylene terephthalate. de Encyclopædia Britannica, Inc. Recuperada el 10/06/2019 de: <https://www.britannica.com/science/polyethylene-terephthalate>
- Aida, K., Moore, R., Negishi, M. 1993. Cloning and nucleotide sequence of a novel, male-predominant carboxylesterase in mouse liver. *Biochimica et biophysica acta*, 1174(1), 72–74. doi:10.1016/0167-4781(93)90093-s
- Al-Sabagh, A. M., Yehia, F. Z., Eshaq, G., Rabie, A. M., ElMetwally, A. E. 2016, marzo 1. Greener routes for recycling of polyethylene terephthalate. *Egyptian Journal of Petroleum*, Vol. 25. doi:10.1016/j.ejpe.2015.03.001
- Allen, W. E., Zicha, D., Ridley, A. J., Jones, G. E. 1998. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *Journal of Cell Biology*, 141(5), 1147–1157. doi:10.1083/jcb.141.5.1147
- Autexier, C., Lue, N. F. 2006. The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 493–517. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142412
- Bandyopadhyay-Ghosh, S., Ghosh, S. B., Sain, M. 2015. The use of biobased nanofibres in composites. *Biofiber Reinforcements in Composite Materials*. doi:10.1533/9781782421276.5.571
- Bennett, V., Baines, A. J. 2001. Spectrin and ankyrin-based pathways: Metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiological Reviews*, Vol. 81. doi:10.1152/physrev.2001.81.3.1353
- Berne, B., Pecora, R. 2000. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics* (Dover Books on Physics). doi:citeulike-article-id:1974486
- Biswas, S. K., Gangi, L., Paul, S., Schioppa, T., Saccani, A., Sironi, M., Bottazzi, B., Doni, A., Vincenzo, B., Pasqualini, F., Vago, L., Nebuloni, M., Mantovani, A., Sica, A. 2006. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF- κ B and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood*, 107(5), 2112–2122. doi:10.1182/blood-2005-01-0428
- Boerger, C. M., Lattin, G. L., Moore, S. L., Moore, C. J. 2010. Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. *Marine Pollution Bulletin*, 60(12), 2275–2278. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.08.007
- Boudin, H., Louveau, A. 2015. Role of Fundamental Pathways of Innate and Adaptive Immunity in Neural Differentiation: Focus on Toll-like Receptors, Complement System, and T-Cell-Related Signaling. *Neural Surface Antigens: From Basic Biology Towards Biomedical Applications*. doi:10.1016/B978-0-12-800781-5.00005-0
- Bradbury, S. 2019. Encyclopædia Britannica, inc. Consultado el 20 de noviembre de 2019, de Transmission electron microscope instrument Britannica. Recuperada el 30/06/2019 de: <https://www.britannica.com/technology/transmission-electron-microscope>
- Bragg, W. L. 1929. The diffraction of short electromagnetic Waves by a Crystal. 23(45), 153.
- Brown, W. 1993. *Dynamic light scattering: the method and some applications* (Vol. 313). Oxford: Clarendon Press.

- Callister, W. D. W. d W. D., Rethwisch, D. G. D. g, Wiley, J. 2007. Materials science and engineering: an introduction. *Materials Science and Engineering*, 7(6058), 266–267. doi:10.1016/0025-5416(87)90343-0
- Castrillo, A., Pennington, D. J., Otto, F., Parker, P. J., Owen, M. J., Boscá, L. 2001. Protein kinase C ϵ is required for macrophage activation and defense against bacterial infection. *Journal of Experimental Medicine*, 194(9), 1231–1242. doi:10.1084/jem.194.9.1231
- Chae, Y., Kim, D., Kim, S. W., An, Y. J. 2018. Trophic transfer and individual impact of nano-sized polystyrene in a four-species freshwater food chain. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. doi:10.1038/s41598-017-18849-y
- Chan, Y. L., Paz, V., Olvera, J., Wool, I. G. 1990. The primary structure of rat ribosomal protein S16. *FEBS Letters*, 263(1), 85–88. doi:10.1016/0014-5793(90)80711-Q
- Clukey, K. E., Lepczyk, C. A., Balazs, G. H., Work, T. M., Lynch, J. M. 2017. Investigation of plastic debris ingestion by four species of sea turtles collected as bycatch in pelagic Pacific longline fisheries. *Marine Pollution Bulletin*, (February), 0–1. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.04.064
- Cornman, R. S. 2010. The distribution of GYR- and YLP-like motifs in drosophila suggests a general role in cuticle assembly and other protein-protein interactions. *PLoS ONE*, 5(9), 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0012536
- Coulombe, B., Ponton, A., Kerbel, R. S., Skup, D. 1992. Structure and function of murine TIMP gene. *Matrix* (Stuttgart, Germany). Supplement, 1, 269–274. Recuperada el 21/07/2019 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1480036>
- da Costa, J. P., Santos, P. S. M., Duarte, A. C., Rocha-Santos, T. 2016. (Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects. *Science of the Total Environment*, 566–567, 15–26. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.041
- Dai, Z., Zhang, H., Zhou, Q., Tian, Y., Chen, T., Tu, C. 2018. Occurrence of microplastics in the water column and sediment in an inland sea affected by intensive anthropogenic activities *. *Environmental Pollution*, 242, 1557–1565. doi:10.1016/j.envpol.2018.07.131
- De Fusco, M., Marconi, R., Silvestri, L., Atorino, L., Rampoldi, L., Morgante, L., Ballabio, A., Aridon, P., Casari, G. 2003. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na⁺/K⁺ pump α 2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nature Genetics*, 33(2), 192–196. doi:10.1038/ng1081
- Demirel, B., Yaraş, A., Elçiçek, H. 2011. Crystallization Behavior of PET Materials. *BAÜ Fen Bil. Enst. Dergisi Cilt*, 13(1), 26–35.
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., Victor, V. M. 2016. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2016. doi:10.1155/2016/1245049
- Dinnebier, R. E., Billinge, S. J. L. 2008. Chapter 1. Principles of Powder Diffraction. *Powder Diffraction*. doi:10.1039/9781847558237-00001
- Donelli, I., Taddei, P., Smet, P. F., Poelman, D., Nierstrasz, V. A., Freddi, G., Sperimentale, S., Colombo, G. 2009. Enzymatic Surface Modification and Functionalization of PET : A Water Contact Angle , FTIR ,

- and Fluorescence Spectroscopy Study. 103(5), 845–856. doi:10.1002/bit.22316
- Dubrez-Daloz, L., Dupoux, A., Cartier, J. 2008. IAPs: More than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle*, 7(8), 1036–1046. doi:10.4161/cc.7.8.5783
- Dzik, J. M. 2014. Evolutionary Roots of Arginase Expression and Regulation. *Frontiers in Immunology*, 5, 544. doi:10.3389/fimmu.2014.00544
- Edward, J. T. 1970. Molecular volumes and the Stokes-Einstein equation. *Journal of Chemical Education*, 47(4), 261–270. doi:10.1021/ed047p261
- EPRO. 2015. Plastics - the facts 2014/2015: An analysis of European plastics production, demand and waste data. *PlasticEurope*, 1–34. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.01.015
- Eriksson, C., Harry, B. 2003. Origins and Biological Accumulation of Small Plastic Particles in Fur Seals from Macquarie Island. *A Journal of the Human Environment*, 36(6). doi:https://doi.org/10.1579/0044-7447-32.6.380
- Fata, J. E., Leco, K. J., Moorehead, R. A., Martin, D. C., Khokha, R. 1999. Timp-1 is important for epithelial proliferation and branching morphogenesis during mouse mammary development. *Developmental Biology*, 211(2), 238–254. doi:10.1006/dbio.1999.9313
- Fávaro, L., Rubira, A. F., Muniz, E. C., Radovanovic, E. 2007. Surface modification of HDPE, PP, and PET films with KMnO₄ /HCl solutions. *Elsevier Ltd.*, 92, 1219 e 1226.
- Fossi, M. C., Coppola, D., Bainsi, M., Giannetti, M., Guerranti, C., Marsili, L., Panti, C., de Sabata, E., Clò, S. 2014. Large filter feeding marine organisms as indicators of microplastic in the pelagic environment: The case studies of the Mediterranean basking shark (*Cetorhinus maximus*) and fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Marine Environmental Research*, 100, 17–24. doi:10.1016/j.marenvres.2014.02.002
- Fossi, M. C., Panti, C., Guerranti, C., Coppola, D., Giannetti, M., Marsili, L., Minutoli, R. 2012. Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Marine Pollution Bulletin*, 64(11), 2374–2379. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.08.013
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., Luca, M. DE, Ottaviani, E., Benedictis, G. DE. 2000. Inflamm-aging An Evolutionary Perspective on Immunosenescence INTRODUCTION: THE NETWORK HYPOTHESIS OF AGING.
- Gack, M. U., Shin, Y. C., Joo, C. H., Urano, T., Liang, C., Sun, L., Takeuchi, O., Akira, S., Chen, Z., Inoue, S., Jung, J. U. 2007. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature*, 446(7138), 916–920. doi:10.1038/nature05732
- Galluzzi, L., Joza, N., Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Hengartner, M., Abrams, J. M., Tavernarakis, N., Penninger, J., Madeo, F., Kroemer, G. 2008, julio. No death without life: Vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death and Differentiation*, Vol. 15. doi:10.1038/cdd.2008.28
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7). de http://advances.sciencemag.org/content/3/7/e1700782.full
- Geyer, R., Jambeck, J. R., Law, K. L. 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science*

Advances, 3(7), 25–29. doi:10.1126/sciadv.1700782

- Gomes, A. V., Zong, C., Edmondson, R. D., Li, X., Stefani, E., Zhang, J., Jones, R. C., Thyparambil, S., Wang, G. W., Qiao, X., Bardag-Gorce, F., Ping, P. 2006. Mapping the murine cardiac 26S proteasome complexes. *Circulation Research*, 99(4), 362–371. doi:10.1161/01.RES.0000237386.98506.f7
- Gordon, S. 2003. ALTERNATIVE ACTIVATION OF MACROPHAGES. 3(January). doi:10.1038/nri978
- Gridley, T. 2010. Notch signaling in the vasculature. En *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 92). doi:10.1016/S0070-2153(10)92009-7
- Groschwitz, K. 2014. Intestinal Barrier Function: Molecular Regeneration and Disease Pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*, 124(1), 3–22. doi:10.1016/j.jaci.2009.05.038.Intestinal
- Gu, W., Yao, L., Li, L., Zhang, J., Place, A. T., Minshall, R. D., Liu, G. 2017. ICAM-1 regulates macrophage polarization by suppressing MCP-1 expression via miR-124 upregulation. *Oncotarget*, 8(67), 111882–111901. doi:10.18632/oncotarget.22948
- Gu, X. 2016. Imported from <http://m.bib.oxfordjournals.org/content/early/2017/01/14/bib.bbww134.long>. *Briefings in Bioinformatics*, 17(2), 243–248. doi:10.1093/BIB
- Guem, H., Haili, C., Vitnary, C., Xin, B., Jia, S., Shiwen, L., Hai, R. 2013. Cdc48: A Swiss Army Knife of Cell Biology. Recuperado el 12 de abril de 2020, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3791797/>
- Hamlin, J. N. R., Schroeder, L. K., Fotouhi, M., Dokainish, H., Ioannou, M. S., Girard, M., Summerfeldt, N., Melançon, P., Mcpherson, P. S. 2014. Scyl1 scaffolds class II Arfs to specific subcomplexes of coatamer through the c-COP appendage domain. *Journal of Cell Science*. doi:10.1242/jcs.136481
- Hayashi, T., Takahashi, T., Motoya, S., Ishida, T., Itoh, F., Adachi, M., Hinoda, Y., Imai, K. 2001. MUC1 mucin core protein binds to the domain 1 of ICAM-1. En *Digestion*, 2001, 63(SUPPL. 1), pp. 87–92. doi:10.1159/000051917
- Hecht, J. 2018. Laser. de Wncyclopedia Britannica website: <https://www.britannica.com/technology/laser>
- Helmenstine, A. M. 2018. What Is Plastic? Definition in Chemistry. Understand plastic chemical composition and properties, 1. Recuperada el 10/04/2020 de: <https://www.thoughtco.com/plastic-chemical-composition-608930>
- Holland, B. J., Hay, J. N. 2002. The thermal degradation of PET and analogous polyesters measured by thermal analysis-Fourier transform infrared spectroscopy. *Polymer*, 43(6), 1835–1847. doi:10.1016/S0032-3861(01)00775-3
- Holmskov, U., Mollenhauer, J., Madsen, J., Vitved, L., Grønlund, J., Tornøe, I., Kliem, A., Reid, K. B. M., Poustka, A., Skjødt, K. 1999. Cloning of gp-340, a putative opsonin receptor for lung surfactant protein D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19), 10794–10799. doi:10.1073/pnas.96.19.10794
- Hwang, J., Choi, D., Han, S., Choi, J., Hong, J. 2019. An assessment of the toxicity of polypropylene microplastics in human derived cells. *Science of the Total Environment*, 684, 657–669. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.05.071

- Inohara, N., Ding, L., Chen, S., Núñez, G. 1997. harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO. de* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1169772/>
- Inoue, Y. 2017. Characterization of V-set and immunoglobulin domain containing 1 exerting a tumor suppressor function in gastric, lung, and esophageal cancer cells. *Cancer Science*, 108(8), 1701–1714. doi:10.1111/cas.13295
- Johnson, J. E. 1959. X-ray diffraction studies of the crystallinity in polyethylene terephthalate. *Journal of Applied Polymer Science*, 2(5), 205–209. doi:10.1002/app.1959.070020514
- Kaur, G., Dufour, J. M. 2012. Cell lines. *Spermatogenesis*, 2(1), 1–5. doi:10.4161/spmg.19885
- KEGG. 2020. KEGG T01002: 56635. Recueprado el 12 de abril de 2020, de https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?mmu:56635
- Khan, Y. 2018. Characterizing the properties of tissue constructs for regenerative engineering. *Encyclopedia of Biomedical Engineering* (Vol. 1–3). doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.99897-0
- Kimura, K., Cuvier, O., Hirano, T. 2001. Chromosome Condensation by a Human Condensin Complex in *Xenopus* Egg Extracts. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5417–5420. doi:10.1074/jbc.C000873200
- Kloc, M. 2017. Macrophages Origin, functions and Biointervention. *Rennes*.
- Kotarski, M. A., Leonard, D. A., Bennett, S. A., Bishop, C. P., Wahn, S. D., Sedore, S. A., Shrader, M. 1998. The *Drosophila* gene *asteroid* encodes a novel protein and displays dosage-sensitive interactions with *Star* and *Egfr*. *Genome*, 41(2), 295–302. doi:10.1139/g98-021
- Krachler, A. M., Woolery, A. R., Orth, K. 2011. Manipulation of kinase signaling by bacterial pathogens. *Journal of Cell Biology*, 195(7), 1083–1092. doi:10.1083/jcb.201107132
- Latour, Y. L., Gobert, A. P., Wilson, K. T. 2020, febrero 1. The role of polyamines in the regulation of macrophage polarization and function. *Amino Acids*, Vol. 52. doi:10.1007/s00726-019-02719-0
- Lens, S. M., Vader, G., Medema, R. H. 2006. The case for Survivin as mitotic regulator. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(6), 616–622. doi:10.1016/j.ceb.2006.08.016
- Liao, Y. C., Wang, Y. S., Guo, Y. C., Lin, W. L., Chang, M. H., Juo, S. H. H. 2014. Let-7g improves multiple endothelial functions through targeting transforming growth factor-beta and sirt-1 signaling. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(16), 1685–1694. doi:10.1016/j.jacc.2013.09.069
- Lim, S. L., Ng, C. T., Zou, L., Lu, Y., Chen, J., Bay, B. H., Shen, H. M., Ong, C. N. 2019. Targeted metabolomics reveals differential biological effects of nanoplastics and nanoZnO in human lung cells. *Nanotoxicology*, 13(8), 1117–1132. doi:10.1080/17435390.2019.1640913
- Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., Dusinska, M. 2014. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8(3), 233–278. doi:10.3109/17435390.2013.773464

- Magrì, D., Sánchez-Moreno, P., Caputo, G., Gatto, F., Veronesi, M., Bardi, G., Catelani, T., Guarnieri, D., Athanassiou, A., Pompa, P. P., Fragouli, D. 2018. Laser Ablation as a Versatile Tool To Mimic Polyethylene Terephthalate Nanoplastic Pollutants: Characterization and Toxicology Assessment. *ACS Nano*, 12(8), 7690–7700. doi:10.1021/acsnano.8b01331
- Masó, M., Garcés, E., Pagès, F., Camp, J. 2003. Drifting plastic debris as a potential vector for dispersing Harmful Algal Bloom (HAB) species. *Scientia Marina*, 67(1), 107–111. doi:10.3989/scimar.2003.67n1107
- Migone, T., Lin, J., Cereseto, A., Mulloy, J., O’Shea, J., Franchini, G., Leonard, W. 1995. Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science*, 269(5220), 79–81. doi:10.1126/science.7604283
- Mikhed, Y., Daiber, A., Steven, S. 2015, julio 13. Mitochondrial oxidative stress, mitochondrial DNA damage and their role in age-related vascular dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 16. doi:10.3390/ijms160715918
- Mills, C. D. 2001. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: A life or death issue. *Critical Reviews in Immunology*, Vol. 21. doi:10.1615/CritRevImmunol.v21.i5.10
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., Hill, A. M. 2000. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166–6173. doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166
- Nakatsukasa, M., Kawasaki, S., Yamasaki, K., Fukuoka, H., Matsuda, A., Tsujikawa, M., Tanioka, H., Nagata-Takaoka, M., Hamuro, J., Kinoshita, S. 2010. Tumor-associated calcium signal transducer 2 is required for the proper subcellular localization of claudin 1 and 7: Implications in the pathogenesis of gelatinous drop-like corneal dystrophy. *American Journal of Pathology*, 177(3), 1344–1355. doi:10.2353/ajpath.2010.100149
- NCBI. 2020. ST7 suppression of tumorigenicity 7 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Recuérado el 12/04/2020 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=7982>
- Neish, A. S., Naumann, M. 2011, diciembre. Microbial-induced immunomodulation by targeting the NF- κ B system. *Trends in Microbiology*, Vol. 19. doi:10.1016/j.tim.2011.08.004
- Nian, H., Fan, C. 2007. RNF151, a testis-specific RING finger protein, interacts with dysbindin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 465(1), 157–163. doi:10.1016/j.abb.2007.05.013
- Nicastro, K. R., Lo Savio, R., McQuaid, C. D., Madeira, P., Valbusa, U., Azevedo, F., Casero, M., Lourenço, C., Zardi, G. I. 2018. Plastic ingestion in aquatic-associated bird species in southern Portugal. *Marine Pollution Bulletin*, 126(July 2017), 413–418. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.11.050
- Ozaltin, K., Lehocky, M., Humpolicek, P., Pelkova, J., Martino, A. Di, Karakurt, I., Saha, P. 2019. Anticoagulant Polyethylene Terephthalate Surface by Plasma-Mediated Fucoidan Immobilization. *Polymers*, 1–12.
- Pearson, G. 2001. Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine reviews*, 22(2). doi:10.1210/EDRV.22.2.0428

- Pes, D., Pelosi, P. 1995. Odorant-binding proteins of the mouse. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and*, 112(3), 471–479. doi:10.1016/0305-0491(95)00063-1
- Petermann, J., Moritz, H., Rieck, U., Wood, B. A., Thomas, E. L. 1989. A novel TEM dark-field contrast method for semi-crystalline polymers. En *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE LETTERS* (Vol. 8).
- Peterson, D. 2010. Confocal Microscopy. *Elsevier*, 250–252.
- Pham, C. K., Rodríguez, Y., Dauphin, A., Carriço, R., Frias, J. P. G. L., Vandeperre, F., Otero, V., Santos, M. R., Martins, H. R., Bolten, A. B., Bjorndal, K. A. 2017. Plastic ingestion in oceanic-stage loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) off the North Atlantic subtropical gyre. *Marine Pollution Bulletin*, 121(1–2), 222–229. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.06.008
- Poma, A., Vecchiotti, G., Colafarina, S., Zarivi, O., Aloisi, M., Arrizza, L., Chichiriccò, G., Di Carlo, P. 2019. In Vitro Genotoxicity of Polystyrene Nanoparticles on the Human Fibroblast Hs27 Cell Line. *Nanomaterials*, 9(9), 1299. doi:10.3390/nano9091299
- Prasad, A., Qamri, Z., Wu, J., Ganju, R. K. 2007. Slit-2/Robo-1 modulates the CXCL12/CXCR4-induced chemotaxis of T cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(3), 465–476. doi:10.1189/jlb.1106678
- Priehl, B., Meindl, C., Roblegg, E., Pieber, T. R., Lanzer, G., Fröhlich, E. 2014. Nano-sized and micro-sized polystyrene particles affect phagocyte function. *Cell Biology and Toxicology*, 30(1), 1–16. doi:10.1007/s10565-013-9265-y
- Qiu, X. B., Shao, Y. M., Miao, S., Wang, L. 2006, noviembre. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 63. doi:10.1007/s00018-006-6192-6
- Radboud University. 2019. Infrared Spectroscopy - Systems Chemistry. Recuperado el 2/11/2019, de <https://www.ru.nl/systemschemistry/equipment/optical-spectroscopy/infrared/>
- Reynolds, C., Ryan, P. G. 2018. Micro-plastic ingestion by waterbirds from contaminated wetlands in South Africa. *Marine Pollution Bulletin*, 126, 330–333. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.11.021
- Rochman, C. M. 2015. The complex mixture, fate and toxicity of chemicals associated with plastic debris in the marine environment. In *Marine anthropogenic litter*. (Cham, Ed.). *Springer*.
- Rochman, Chelsea M., Browne, M. A., Halpern, B. S., Hentschel, B. T., Hoh, E., Karapanagioti, H. K., Rios-Mendoza, L. M., Takada, H., Teh, S., Thompson, R. C. 2013, febrero 14. Policy: Classify plastic waste as hazardous. *Nature*, Vol. 494. doi:10.1038/494169a
- Rodríguez-Hernández, A. G., Muñoz-Tabares, J. A., Aguilar-Guzmán, J. C., Vazquez-Duhalt, R. 2019. A novel and simple method for polyethylene terephthalate (PET) nanoparticle production. *Environmental Science: Nano*, 6(7), 2031–2036. doi:10.1039/c9en00365g
- Rolland, T., Taşan, M., Charlotiaux, B., Pevzner, S. J., Zhong, Q., Sahni, N., Yi, S., Lemmens, I., Fontanillo, C., Mosca, R., Kamburov, A., Ghiassian, S. D., Yang, X., Ghamsari, L., Balcha, D., Begg, B. E., Braun, P., Brehme, M., ... Vidal, M. 2014. A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell*, 159(5), 1212–1226. doi:10.1016/j.cell.2014.10.050

- Ruan, H.-Y., Yang, C., Tao, X.-M., He, J., Wang, T., Wang, H., Wang, C., Jin, G.-Z., Jin, H.-J., Qin, W.-X. 2017. Downregulation of ACSM3 promotes metastasis and predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *American journal of cancer research*, 7(3), 543–553. Recuperado el 13/07/2020 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28401010>
- Ryan, P. G., Moore, C. J., van Franeker, J. A., Moloney, C. L. 2009. Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1999–2012. doi:10.1098/rstb.2008.0207
- Schirinzi, G. F., Pérez-Pomeda, I., Sanchís, J., Rossini, C., Farré, M., Barceló, D. 2017. Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environmental Research*, 159, 579–587. doi:10.1016/j.envres.2017.08.043
- Schmidt, H. H. H. W., Stocker, R., Vollbracht, C., Paulsen, G., Riley, D., Daiber, A., Cuadrado, A. 2015. Antioxidants in Translational Medicine. *Antioxidants and Redox Signaling*, 23(14), 1130–1143. doi:10.1089/ars.2015.6393
- Sica, A., Mantovani, A. 2012, marzo 1. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 122. doi:10.1172/JCI59643
- SIGMA-ALDRICH. 1997. TRI Reagent BD For processing whole blood, plasma, or serum. 1–5.
- Singh, B., Sharma, N. 2008. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability*, 93(3), 561–584. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008
- Spieß, L., Teichert, G., Schwarzer, R., Behnken, H., Genzel, C. 2019. Moderne Röntgenbeugung. En *Moderne Röntgenbeugung*. doi:10.1007/978-3-8348-8232-5
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., Gordon, S. 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immunologic macrophage activation. *Journal of Experimental Medicine*, 176(1), 287–292. doi:10.1084/jem.176.1.287
- Strohner, R., Nemeth, A., Jansa, P., Hofmann-Rohrer, U., Santoro, R., Längst, G., Grummt, I. 2001. NoRC-- a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *The EMBO journal*, 20(17), 4892–4900. doi:10.1093/emboj/20.17.4892
- Stuart, B. 2005. Infrared Spectroscopy. En *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. doi:10.1002/0471238961.0914061810151405.a01.pub2
- Sumandea, M. P., Pyle, W. G., Kobayashi, T., De Tombe, P. P., Solaro, R. J. 2003. Identification of a functionally critical protein kinase C phosphorylation residue of cardiac troponin T. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35135–35144. doi:10.1074/jbc.M306325200
- Sunderkotter, C., Steinbrink, K., Goebeler, M., Bhardwaj, R., Sorg, C. 1994. Macrophages and angiogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, 55(3), 410–422. doi:10.1002/jlb.55.3.410
- Tang, C. Y., Yang, Z. 2017. Transmission Electron Microscopy (TEM). En *Membrane Characterization*. doi:10.1016/B978-0-444-63776-5.00008-5
- Tang, X., Woodward, T., Amar, S. 2009. A PTP4A3 peptide PIMAP39 modulates TNF-alpha levels and endotoxic shock. *Journal of Innate Immunity*, 2(1), 43–55. doi:10.1159/000235685

- Tanihara, H., Kido, M., Obata, S., Heimark, R. L., Davidson, M., St John, T., Suzuki, S. 1994. Characterization of cadherin-4 and cadherin-5 reveals new aspects of cadherins. *Journal of cell science*, 107 (Pt 6)(6), 1697–1704. Recuperada el 10/07/2020 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7962210>
- Taub, I., Singh, R. 1997. Food storage stability. Recuperada el 10/07/2020 de: <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=3oQbpjMx6yIC&oi=fnd&pg=PA1&ots=gGk3dvyRnn&sig=3uls4pVGXwX9XhpqO2wwi4AXxc4>
- Tenzer, S., Docter, D., Kuharev, J., Musyanovych, A., Fetz, V., Hecht, R., Schlenk, F., Fischer, D., Kiouptsi, K., Reinhardt, C., Landfester, K., Schild, H., Maskos, M., Knauer, S. K., Stauber, R. H. 2013. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature Nanotechnology*, 8(10), 772–781. doi:10.1038/nnano.2013.181
- The Editors of Encyclopaedia Britannica. 2018. Polyethylene terephthalate. *Encyclopedia Britannica*, inc. Recuperada el 15/07/2020 de: <https://www.britannica.com/science/polyethylene-terephthalate>
- Valeur, B. 2001. Molecular Fluorescence Principles and Applications (Vol. 8). WILEY-VCH: Weinheim.
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K., Hess, M., Hodge, P.; Kubisa, P., Rinaudo, M.; Schue, F. 2012. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.*, 84(2), 377–410. doi:10.1351/PAC-REC-10-12-04
- Wen, B., Jin, S., Chen, Z., Gao, J. 2018. Single and combined effects of microplastics and cadmium on the cadmium accumulation, antioxidant defence and innate immunity of the discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*). *Environmental Pollution*, 243, 462–471. doi:10.1016/j.envpol.2018.09.029
- Wick, A. F., Daniels, W. L., Orndorff, Z. W., Alley, M. M. 2013. Organic matter accumulation post-mineral sands mining. *Soil Use and Management*, 29(3), 354–364. doi:10.1111/sum.12058
- Wilkins, A., Ping, Q., Carpenter, C. L. 2004. RhoBTB2 is a substrate of the mammalian Cul3 ubiquitin ligase complex. *Genes and Development*, 18(8), 856–861. doi:10.1101/gad.1177904
- Williams, Carter. 2009. Transmission electron microscopy: A textbook for materials science. En *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*. doi:10.1007/978-0-387-76501-3
- Williams, I. R. 1998. Encyclopedia of Immunology. En *Encyclopedia of Immunology* (Second Edition). doi:<https://doi.org/10.1006/rwei.1999.0237>
- Wu, B., Wu, X., Liu, S., Wang, Z., Chen, L. 2019. Size-dependent effects of polystyrene microplastics on cytotoxicity and efflux pump inhibition in human Caco-2 cells. *Chemosphere*, 221, 333–341. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.01.056
- Xu, M., Halimu, G., Zhang, Q., Song, Y., Fu, X., Li, Y., Li, Y., Zhang, H. 2019. Internalization and toxicity: A preliminary study of effects of nanoplastic particles on human lung epithelial cell. *Science of the Total Environment*, 694, 133794. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.133794
- Yoon, J. H., Her, S., Kim, M., Jang, I. S., Park, J. 2012. The expression of damage-regulated autophagy modulator 2 (DRAM2) contributes to autophagy induction. *Molecular Biology Reports*, 39(2), 1087–1093. doi:10.1007/s11033-011-0835-x
- Zhang, Y., Klaassen, C. D. 2013. Hormonal regulation of Cyp4a isoforms in mouse liver and kidney. *Xenobiotica*, 43(12), 1055–1063. doi:10.3109/00498254.2013.797622

Anexos

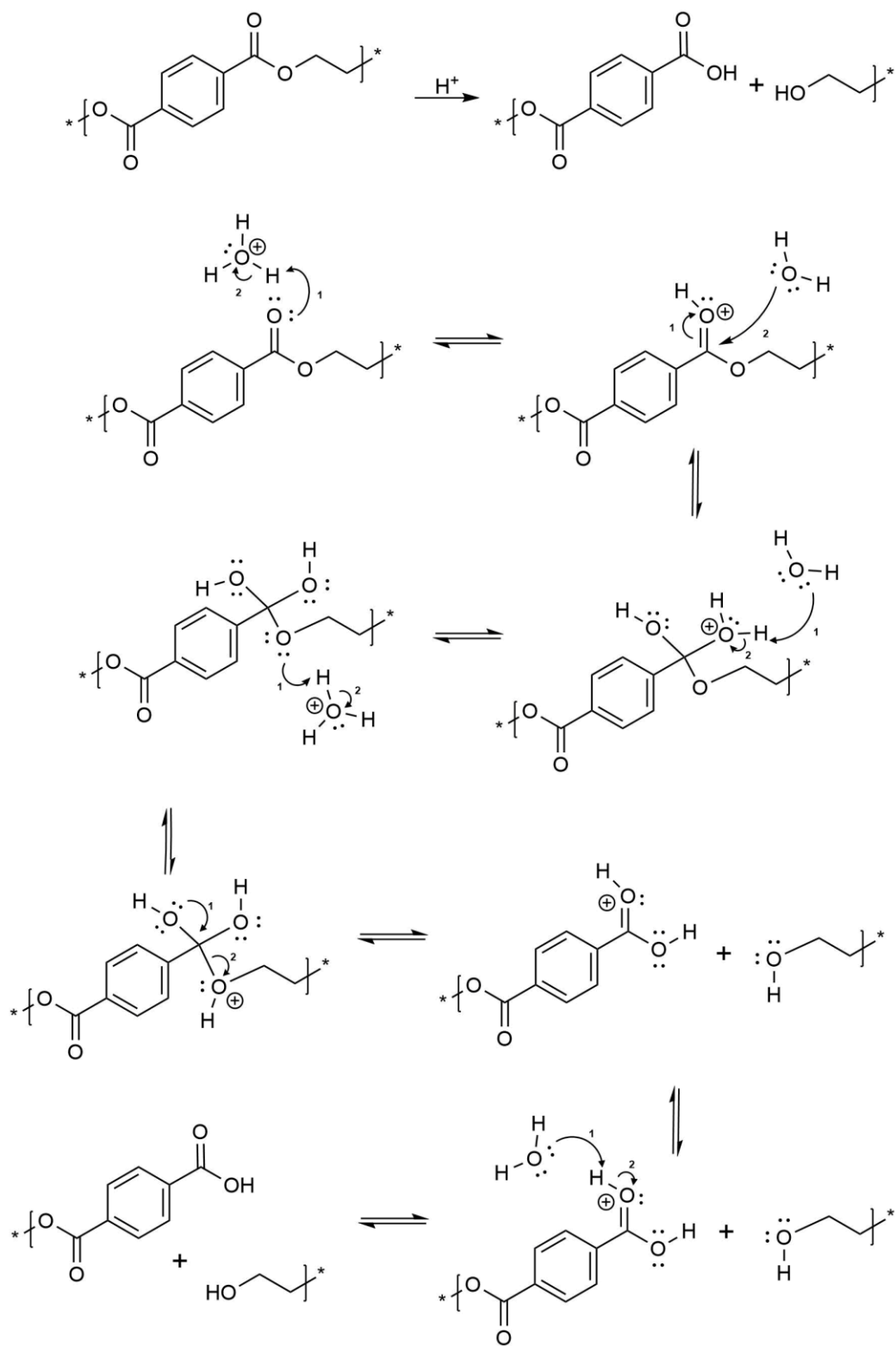


Figura 25. Mecanismo de reacción de la hidrólisis mediante ácidos del PET.