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

Maestría en Ciencia

Nanociencias

Toxicidad de nanopartículas de tereftalato de polietileno (PET) en modelo ex vivo de sistema digestivo de roedor

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

Presenta:

Gabriela Venegas Guerrero

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por

Gabriela Venegas Guerrero

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández
Director de tesis

Miembros del comité
Dr. Alejandro Huerta Saquero

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña

Dra. María del Carmen González Castillo

Dr. Sergio Fuentes Moyado
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Gabriela Venegas Guerrero © 2021
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 Gabriela Venegas Guerrero como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Nanociencias.

Toxicidad de nanopartículas de tereftalato de polietileno (PET) en modelo ex vivo de sistema digestivo de roedor

Resumen aprobado por:

_____

Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández

Directora de tesis

En la actualidad se produce una gran variedad de plásticos debido, al bajo costo de manufacturación y su alta demanda. Sin embargo, los residuos plásticos no tienen un adecuado proceso de reciclado y van directo al océano o a vertederos al aire libre, donde se degradarán por fuerzas mecánicas, pasando de un tamaño macrométrico a un tamaño nanométrico. La ubicuidad del plástico, en especial en forma de micro y nanoplásticos, hace que el ser humano este expuesto a estas partículas sin percatarse, ignorando los posibles efectos a la salud. Se sabe que las partículas en escala nanométrica son capaces de atravesar membranas con gran facilidad provocando alguna reacción no deseada. En el caso particular del tereftalato de polietileno (PET), no existen estudios relacionados con los posibles riesgos a la salud humana, aun cuando es uno de los plásticos más producidos y usados en la industria de alimentos. Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo el evaluar los efectos que tienen las nanopartículas de PET en el tejido intestinal, mediante el uso de un modelo *ex vivo*. Para cumplir con este objetivo, anillos intestinales de roedor fueron expuestos a diferentes concentraciones de nanopartículas de PET, con el fin de observar su comportamiento por medio del análisis del perfil fisiológico (contracción/relajación). Asimismo, las nanopartículas fueron expuestas en fluidos simulados intestinales y gástricos, con soluciones ricas en iones, durante 20 días midiendo los cambios en el radio hidrodinámico (tamaño). Se descubrió que las nanopartículas de PET interactúan con el ion Calcio afectando la función de contracción/relajación de tejido, lo que podría afectar el funcionamiento del intestino. Las nanopartículas mostraron un proceso de aglomeración al estar en contacto con medios ricos en iones, mientras que en medios ricos en materia orgánica el diámetro hidrodinámico fue menor y más estable, esto posiblemente debido a la formación de una corona. Estos resultados muestran que la interacción de las nanopartículas con los componentes del medio en el que se encuentran, determinaran su interacción con el tejido intestinal, sin embargose requieren más estudios in vivo y a largo plazo, para poder analizar con detalle los efectos a nivel tisular, los posibles mecanismos de absorción y su biodistribución.

Palabras clave: Nanoplásticos, tereftalato de poliestireno, corona proteica, intestino aislado.

Abstract of the thesis presented **by Gabriela Venegas Guerrero** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanocience

Toxicity of polyethylene terephthalate (PET) nanoparticles in ex vivo model in rodent digestive system

Abstract approved by:

_____

Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández.
Thesis Director

Today a wide variety of plastics are produced due to the low cost of manufacture and its high demand. However, plastic waste does not have an adequate recycling process and goes straight to the ocean or outdoor landfills, where it will degrade by mechanical forces, from a micrometric size to a nanometer size. The ubiquity of plastic, especially in the form of micro and nanoplastics, causes humans to be exposed to these particles without realizing it, ignoring the possible health effects. Nanoscale particles are known to be able to pass through membranes with great ease causing some unwanted reactions. In the case of polyethylene terephthalate (PET), there are no studies related to the potential risks to human health, even though it is one of the most produced and used plastics in the food industry. Therefore, this work aims to evaluate the effects that PET nanoparticles have on intestinal tissue, by using an ex vivo model. To meet this goal, rodent intestinal rings were exposed to different concentrations of PET nanoparticles, to observe their behavior by analyzing the physiological profile (contraction/relaxation). Also, nanoparticles were exposed in simulated intestinal and gastric fluids, with solutions rich in ions, for 20 days measuring changes in hydrodynamic radius (size). PET nanoparticles were found to interact with calcium ion affecting tissue shrinkage/relaxation function, which could affect bowel function. Nanoparticles showed a process of agglomeration by being in contact with iron-rich media, while in organic-rich media the hydrodynamic diameter was smaller and more stable, possibly due to the formation of a crown. These results show that the interaction of nanoparticles with the components of the environment in which they are located, will determine their interaction with intestinal tissue, however more in vivo and long-term studies are required, to be able to analyze in detail the effects on the tissue level, the possible absorption mechanisms, and their biodistribution.

Keywords: Nanoplastics, polystyrene terephthalate, protein crown, isolated intestine.

Dedicatoria

Agradezco a Dios, por otorgarme unos padres maravillosos, quienes me han dado su apoyo, por creer en mí, en darme palabras de alientos y consejos, es por eso por lo que dedico el presente trabajo, porque no solo es mi logro si no el de ellos. Ignacio y Luz María, gracias.

A mis dos hermanas, Coral y Fátima Alejandra, gracias por el apoyo y por hacer mi vida mucho mejor, me siento afortunada por tenerlas y compartir mis logros.

Agradecimientos

A la Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández por darme la oportunidad de crecer académicamente, por enseñarme “un mundo nano” el cual yo desconocía, por mostrarme nuevos instrumentos y técnicas que yo ignoraba de su existencia, también al brindarme consejos y corregir mis errores. Gracias por haberme abierto un poco más mi mundo.

Al Dr. Alejandro Huerta Saqueros por brindarme ayuda cuando lo necesitaba no solo en lo académico, sino también en lo personal al brindarme palabras de aliento, por su gran apoyo y por ser tan considerado, como cuando nadie quería que apagara las velas del pastel, por qué estaba enferma, pero usted prendió una velita para que yo la apagara, gracias. También le agradezco el haberme enseñado sobre las bacterias, aunque creo que no es lo mío. Gracias por todo Doctor.

A la Dra. Ana Bertha Castro Ceseña, por haberme brindado conocimientos, por corregirme y hacerme ver mis errores, aunque yo me negaba a ver, le agradezco mucho, gracias por tenerme paciencia y por tolerar mis berrinches, gracias por su apoyo y ofrezco una disculpa.

A la Dra. María del Carmen, por brindarme la oportunidad de aprender runa nueva técnica. También agradezco el haberme aceptado en su laboratorio y por presentarme a personas maravillosas como la Dra. Gabriela Navarro Tovar, Dra. Aida Jimena Velarde Salcedo, ing. Nano. Jesús Roberto Vargas Ortiz, M. en C. Jorge Antonio Chevez Hernández, a Juan Jesús Ramos Capuchino quien fue el me instruyo para poder usar el quipo y realizar mis experimentos, y a Liliana González Castillo.

Al Dr. Rafael Vázquez Duhal y la técnica Katrin Quester que a pesar de que no convivimos y platicamos mucho, me hicieron sentir cómoda en el laboratorio. Gracias por su ayuda y por haberme abiertos las puertas del laboratorio. También quiero agradecer al Dr. Andrés Zarate por ayudarme y por brindarme algunos de sus conocimientos, gracias.

A la técnica Itandehui Betanzos Gutiérrez y al Dr. Oscar Davis mejor conocido como “Don Oscar”, por hacer mi estadía en el laboratorio mucho mejor, por brindarme horas de diversión, gracias por apoyarme, darme consejos y palabras de aliento cuando más lo necesitaba, pero sobre todo a pensar positivo, por no permitir que me sintiera sola, los voy a extrañar. Gracias por todo. A por cierto Don Oscar tiene que ser mi glucosa amigo.

A mis amigos Jorge, Samantha, Jessica y Jonathan de la Ciudad de México por brindarme apoyo y palabras de ánimo, gracias por creer en mí. A mis nuevos amigos Gloria, Santino, Ysamara, Marilyn, Daniel, Gabriel, Carmen, Gerardo, Carlos, Iban, Kendra, Mary Paz, Luz, Andrés, a la Futura Dra. AnaId, gracias por enseñarme la técnica de extracción de ADN, Lalo, Luis, José, Salvador, a Esmeralda "Maya", por brindarme su amistad, por no dejarme caer, aunque estas palabras se quedan cortas a todo lo que me gustaría decir, a la señora Rosy por sus deliciosos bolis que me refrescaban y por brindarme una sonrisa, a Lizeth, Meño, Ángel, German, Leonardo. A mis compañeros de maestría con los que compartí algunas risas y experiencias, a pesar de que no convivimos mucho, les deseo lo mejor, gracias.

A la familia Ozuna por brindarme un lugar a donde llegar y donde vivir durante dos años, gracias por procurarme.

A CICESE, a toda su comunidad, que son personas muy amables, en especial a Rufina Hernández, Citlali Romero Manzano, Dolores Sarracino Ramírez, y a Elizabeth Avilés, que nos hacen a los estudiantes la vida más fácil y nos apoyan muchisimo, también por brindarme un apoyo económico para mi estancia. A mis profesores, gracias por transmitirme sus conocimientos y por contestar mis dudas.

A la comunidad UNAM- CNyN por haberme abierto las puertas y ser parte de su comunidad durante dos años, por su apoyo económico para mi estancia. Laura Adriana rosales Vásquez, Laura Osuna Alatorre y Núñez Aguilar Juan Francisco, gracias por todo. Y gracias a los alumnos de licenciatura.

Y, por último, pero no menos importante, a CONACYT por brindarme el apoyo económico necesario para poder realizar este trabajo.

Tabla de contenido

Página

Resumen en español…… ii
Resumen en inglés…… iii
Dedicatorias…… iv
Agradecimientos…… v
Lista de figuras…… ix
Lista de tablas…… xi
Lista de abreviaturas…… xii

Capítulo 1. Introducción

Introducción…… 1
1.1 ¿Qué son los polímeros?…… 1
1.1.1 Clasificación de los polímeros…… 2
1.1.2 Tereftalato de polietileno (PET)…… 4
1.1.3 Panorama general de la contaminación de los polímeros…… 5
1.2 Nanotecnología y nanopartículas…… 7
1.2.1 Origen de las micro y nanopartículas plásticas…… 7
1.2.2 Introducción a la cadena trófica y vías de exposición para el ser humano…… 9
1.2.3 Micro y nanoplásticos en el intestino…… 11
1.3 Sistema digestivo…… 12
1.3.1 Tracto digestivo…… 12
1.3.1.1 Microbiota intestinal…… 14
1.3.2 Histología del intestino delgado…… 15
1.3.3 Contracción muscular…… 16
1.4 Antecedentes …… 19
1.5 Justificación…… 21
1.6 Hipótesis …… 21
1.7 Objetivos…… 21
1.7.1 Objetivo general …… 21
1.7.2 Objetivos específicos…… 21

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cuadro sinóptico..... 23
2.2 Síntesis de nanopartículas..... 24
2.3 Efecto de las nanopartículas plásticas sobre la contracción/relajación del musculo intestina..... 24
2.4 Estabilidad de nanopartículas en diferentes fluidos simulados..... 26

Capítulo 3. Resultados

3.1 Síntesis de nanopartículas 28
3.2 Efecto de las nanopartículas plásticas sobre la contracción del musculo intestinal de roedor 29
3.3 Estabilidad de nanopartículas plásticas en diferentes fluidos simulados..... 34

Capítulo 4. Discusión

Discusión..... 39

Capítulo 5. Conclusiones

5.1 Conclusiones generales..... 45
5.2 Perspectivas 45

Literatura citada..... 47

Anexos..... 52

Lista de figuras

Figura		Página
1	Línea del tiempo de las principales eras de la Humanidad. ……	1
2	Tipos de estructuras de la cadena de los polímeros ……	3
3	Clasificación de polímeros según la cantidad de producción ……	3
4	Estructura química del PET……	5
5	Principales países productores de plásticos a nivel mundial ……	6
6	Escala de tamaño ……	7
7	Clasificación de plásticos según su tamaño……	8
8	Cadena trófica con las posibles rutas a seguir de los plásticos……	10
9	Exposición humana vía oral y la posible trayectoria de las micro y nanopartículas plásticas ……	11
10	Imagen del sistema digestivo ……	13
11	Corte histológico del intestino ……	15
12	Principales tipos de músculo ……	16
13	Principales componentes que interviene en la contracción muscular ……	17
14	Esquema de la contracción de un musculo liso ……	18
15	Resultados obtenidos de las diferentes muestras experimentales y las diferentes nano y micromateriales plásticos ……	20
16	Esquema del plan de trabajo general para este estudio……	23
17	Tamaño de las partículas presentes en la mezcla heterogénea……	28
18	Perfil fisiológico de las concentraciones bajas……	30
19	Perfil fisiológico de las concentraciones altas ……	31
20	Representación gráfica del nivel de tensión y nivel de contracción de las concentraciones bajas ……	33
21	Representación gráfica del nivel de tensión y nivel de contracción de las concentraciones altas ……	34

22	Graficas del diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de PET al estar expuesta a medios ricos en electrolitos	35
23	Graficas del Potencial Z de las nanopartículas de PET al estar expuesta a medios ricos en electrolitos	36
24	Graficas del diámetro hidrodinámico de la nanopartículas de PET al estar expuesta a medios ricos en materia orgánica	37
25	Graficas del tamaño de las nanopartícula de PET al estar expuesta a medios ricos en materia orgánica.....	38
26	Representación esquemática del sistema usado para medir las variaciones del tono muscular del intestino de roedor.....	52
27	Representación esquemática del mecanismo de contracción/relajación asociada al estímulo del KCl y el nitroprusiato de sodio.....	53
28	Representación esquemática del posible comportamiento de las nanopartículas de PET en diferentes medios.....	54

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Contenido de las soluciones simuladas para cada segmento del tracto digestivo del modelo convencional ……	27
2	Contenido de las soluciones simuladas para cada segmento del tracto digestivo del modelo dinámico ……	27
3	Porcentaje de contracción del tejido al estar en contacto con las concentraciones bajas y altas……	32

Lista de abreviaturas.

$CaCl_2$	Cloruro de calcio
cm	Centímetro
DLS	Dispersión dinámica de Luz
DMT	Dimetiltereftalatiol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EG	Etilglicol
FTIR	Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier
g	Gramos
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada
KCl	Cloruro de potasio
L	Litros
M	Molar
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
µg	Microgramo
µl	Microlitros
mg	Miligramos
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sodio
NaH_2PO_4	Bifosfato de sodio
nm	nanómetro
PE	Polietileno
PEAD	Polietileno de alta densidad
PEBD	Polietileno de baja densidad
PET	Tereftalato de polietileno
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PTA	Ácido tereftálico
PVC	Cloruro de polivinílico
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxigeno
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Microscopia electrónica de barrido
TiO_2	Óxido de Titanio
UV	Luz ultavioleta

Capítulo 1. Introducción

1.1 ¿Qué son los polímeros?

En la historia de la humanidad han existido eventos marcados por el uso y la manipulación de algún material, un claro ejemplo son la edad de piedra y la edad de hierro, en estos momentos podemos decir que estamos en la era de los plásticos o mejor dicho polímeros (Figura 1) (Cózar et al., 2014). Estos dos términos son usados como sinónimos, aunque el término "plásticos" se refiere a todo aquel material que pueda moldearse y el término "polímero" se refiere a la clasificación de una sustancia por su estructura. (Sosa, 2002)

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define al plástico como: "material polimérico, que puede contener otras sustancias para mejorar el rendimiento y / o reducir los costos" (Da Costa et al., 2016)

Los polímeros son largas cadenas moleculares que se forman al unirse miles o cientos de unidades repetidas llamados monómeros mediante enlaces covalentes. A los monómeros unidos se les llama cadena polimérica o esqueleto, estos monómeros están formados por átomos de carbono y pueden poseer un grupo lateral. (Sastre et al., 2004; Hermida, 2011)

Figura 1.Línea de tiempo donde se señalan las principales eras donde se llevó a cabo la manipulación de algún material. (Pérez, 2014)

Los polímeros poseen propiedades especificas las cuales dependen de su estructura, sin embargo, conservan propiedades generales, ya que son malos conductores de electricidad, son materiales muy

versátiles y moldeables y algunos poseen cierta dureza y estabilidad térmica (Sastre et al.,2004). En general son aislantes térmicos, son ligeros, mecánicamente resistentes y posen resistencias a los ácidos, álcalis, y a una gran variedad de solventes (Hermida, 2011).

1.1.1 Clasificación de los polímeros.

Existen diversas formas de clasificar a los polímeros, entre ellas se pueden están: por su origen, por el mecanismo de polimerización, por su composición química, por el número de unidades estructurales o por sus aplicaciones.

En relación con su origen los polímeros pueden provenir de un origen natural producidos por organismos vivos, como son las proteínas, polisacáridos, DNA y RNA; o de origen sintéticos que proviene de reacciones de polimerización de monómeros, principalmente de derivados del petróleo. Estos a su vez pueden dividirse en dos tipos, dependiendo de su estabilidad dimensional en presencia de calor: los termoplásticos (se ablandan con el calor) y termoestables (resistentes al calor) (Hermida, 2011).

Otra clasificación habitual es la que depende de la estructura de la cadena que poseen, puede ser una cadena lineal, ramificada o entrecruzada (Figura 2). Las cadenas ramificadas tienen la característica de ser menos solubles que las lineales, y los entrecruzados son cadenas insolubles. El entrecruzamiento es usado para generar propiedades elásticas, así como para proporcionar rigidez y estabilidad. De igual forma las moléculas lineales y ramificadas pueden ser termoplásticos y las entrecruzadas son termoestables. (Hermida, 2011).

En cuestión de su uso, los polímeros son un grupo muy variado que se emplea en diferentes áreas dependiendo de sus propiedades específicas. En la aeronáutica, podemos mencionar el polímero Kevlar para la fabricación de las colas de los aviones o las puntas de los cohetes debido a su relación rigidez/peso. En el área médica, por ejemplo, se utiliza el polímero cianoacrilato por su baja tensión superficial que le permite cubrir una gran área y penetrar en cualquier cavidad. Este polímero fue usado en la guerra de Vietnam para ayudar a cerrar heridas y detener hemorragias y en México se le conoce comúnmente como KolaLoca. (Sosa, 2003)

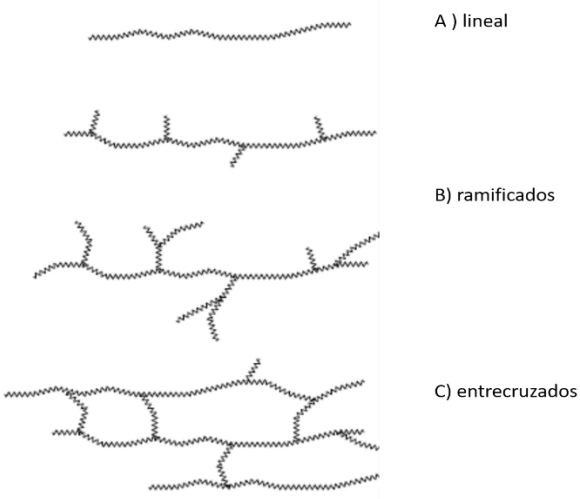

Figura 2. Estructuras de las diferentes cadenas poliméricas. A. Cadena lineal. B. Cadena ramificada y C. Cadena entrecruzada, López (2004).

De toda la variedad de polímeros que existen en el mundo, podemos encontrar a un pequeño grupo que se utiliza con mayor frecuencia en diferentes áreas y se pueden clasificar por el volumen de producción: Cloruro de polivinilo (PVC), Polipropileno (PP), Poliestireno (PS), polietileno de alta densidad (PEAD), Polietileno de baja densidad (PEBD) y el Tereftalato de polietileno (PET) (Figura 3).

Figura 3. Clasificación de los polímeros según la cantidad de producción. Basada en la imagen de la página el blogverde.

Todos estos materiales se usan para la fabricación de bolsas de supermercado, vasos desechables, hule espuma, tuberías, textiles (Sosa, 2002), láminas con múltiples usos, contenedores, electrodomésticos, muebles de jardín, válvulas, ventana, entre muchas otras aplicaciones (PlasticsEurope, 2016).

De entre todos estos plásticos, el PET se ha convertido en uno de los materiales poliméricos más usados, debido a su peso ligero y bajo costo de producción, ocupando el tercer lugar a nivel mundial, con un 7.1%

del total de la producción global en 2015 (PlasticsEurope 2016). El mercado mundial de este polímero se concentra principalmente en América del Norte, Europa, Asia y Pacifico. De estas regiones, Asia y el Pacifico liderean el mercado de PET (García, 2017).

1.1.2 Tereftalato de polietileno (PET).

El tereftalato de polietileno (PET) es un polímero termoelástico, que se obtiene mediante la policondensación del ácido tereftálico (PTA) y el etilglicol (EG), aunque también se puede obtener utilizando dimetiltereftalato (DMT) en lugar de PTA (García, 2017) (Figura 4). Entre las características que posee es que tiene una alta resistencia al desgaste, a la corrosión química y mecánica, es liviano, inerte (al contenido) y puede ser mezclado con otros materiales como la celulosa para formar materiales compuestos con aplicaciones en la construcción como películas para invernaderos, en la realización de asfaltos concretos y la fabricación de ladrillos (Jaramillo et al., 2014). Otras de las propiedades que posee es una alta resistencia mecánica, rigidez, dureza, baja expansión térmica, buena resistencia a la formación de fracturas, baja absorción de humedad, buenas propiedades como aislante eléctrico y resistente a la radiación. (Beeva et al., 2015).

El PET es usado en dos grandes industrias; en la industria textil para la fabricación de hilos y filamentos y en la industria alimentaria donde tiene una mayor aplicación; lo que ha provocado, un incremento considerable en su producción en los últimos años. Una gran cantidad de estos productos son envases de un solo uso como, las botellas de refrescos, las botellas de agua, los botes de mayonesa, enjuague bucal, aceite, vinagre, etc.; lo cual genera una gran cantidad de desechos proporcional a su producción. Esta cantidad de basura tiene un gran impacto ambiental, ya que se estima que la mayoría de los plásticos incluyendo el PET, tardan en degradarse aproximadamente 500 años (Jaramillo et al., 2014).

Otra desventaja que posee el PET y la mayoría de estos polímeros es que tienen un número finito de reciclado, no se degrada de forma natural, y en el caso de un proceso de fundición, este puede liberar sustancias tóxicas cuando es sometido a temperaturas por arriba de los 230°C (Lehner et al., 2019).

Como ya se mencionó el PET al igual que otros plásticos poseen una alta durabilidad, no obstante, esta propiedad ha provocado los principales problemas de contaminación ambiental.

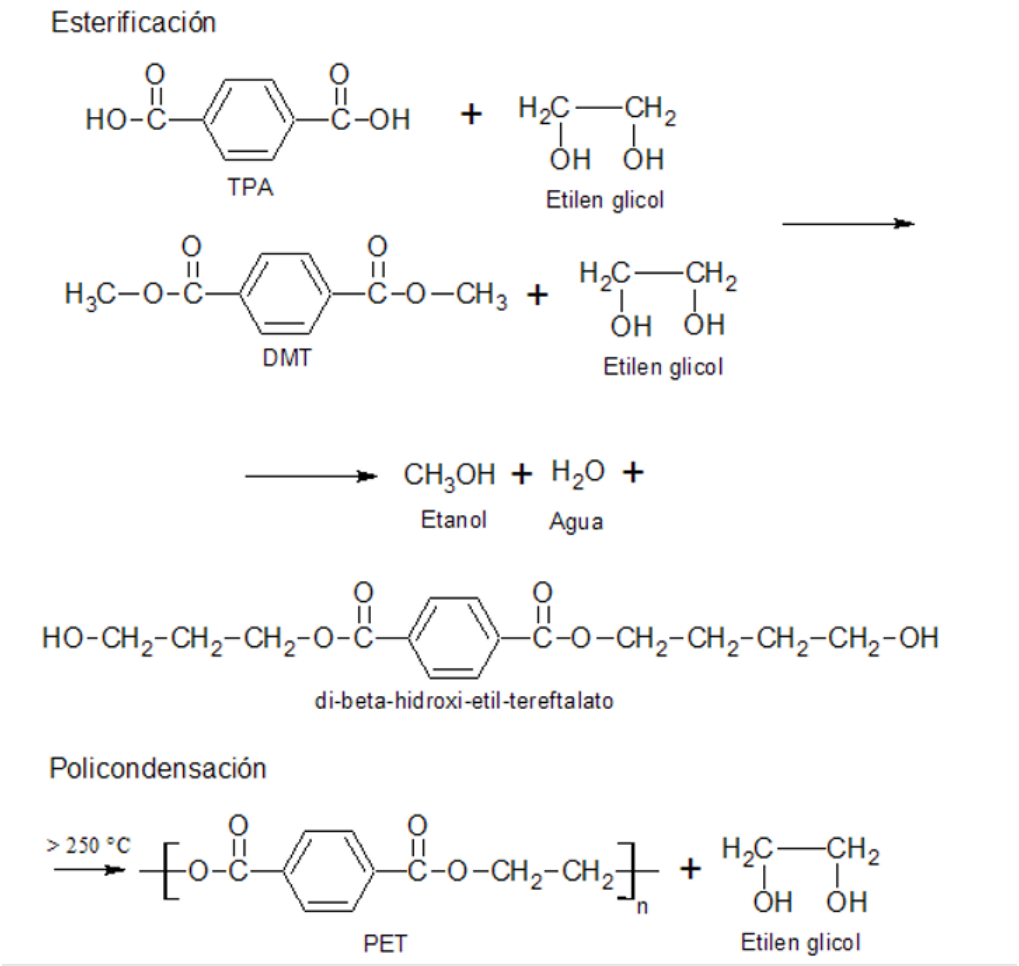

Figura 4. Fórmula química del PET y proceso para la polimerización del PET mediante el uso de TPA y DMT. García, 2017.

1.1.3 Panorama general de la contaminación de los plásticos.

Debido a su versatilidad y sus propiedades físicas y químicas, los plásticos son usados en la actualidad en diferentes industrias, sin mencionar que ofrecen grandes ventajas económicas ya que, los costos de producción, síntesis y manufactura son muy bajos (Cristan, 2003). Debido a esto, existe un aumento constante en la producción mundial de estos materiales, así como el incremento en su consumo y, por lo tanto, también la acumulación continúa de desechos.

En el 2013 la producción mundial de plásticos fue aproximadamente de 288 a 300 millones de toneladas (Phuong et al., 2016; Toussaint et al., 2019), y para el 2016 se produjeron más de 335 millones de toneladas

(Lehner et al., 2019), donde los principales países productores son Europa, China, América del Norte (Figura 5). Sin embargo, no todo el porcentaje producido entra a un proceso de reciclado, un ejemplo es el caso de Europa, ya que, del total de polímeros producidos en el 2012, solo el 26% entró en un proceso de reciclado, mientras que el 36% fue incinerado para crear energía y el 38% fue depositado en vertederos. De la basura de los vertederos se estima que un total de 20 millones de toneladas de polímeros acaban en los océanos (Toussaint et al., 2019), donde son llevados por las corrientes marinas hasta ciertos puntos de convergencia de las corrientes donde se forman las llamadas “islas de plásticos” (Da Costa et al., 2016).

Aunque ha habido avances en el manejo de la basura plástica con un incremento en el reciclaje e incineración, los datos de Plastic Europe menciona que para el año 2014 el 29.7 % del plástico producido entró en un proceso de reciclado, del remanente un 39.5% se incineró y el 30.8% restante fue enviado a vertederos al aire libre. (PlasticsEurope 2016).

En cuanto a las regiones con mayor producción del PET, se encuentran Asia y el Pacifico (García, 2017) (Figura 5). Por otro lado, México no es un productor de PET, pero es uno de los principales países consumidores a nivel mundial. De acuerdo con Botero y colaboradores, en el 2010, México se convirtió en el primer país consumidor de agua embotellada y el segundo en bebidas carbonatadas en todo el mundo. (Botero, 2014). En el 2008, en México se reportó una producción de 12. 513 toneladas de basura y de estos residuos, los plásticos representaron el 11%.

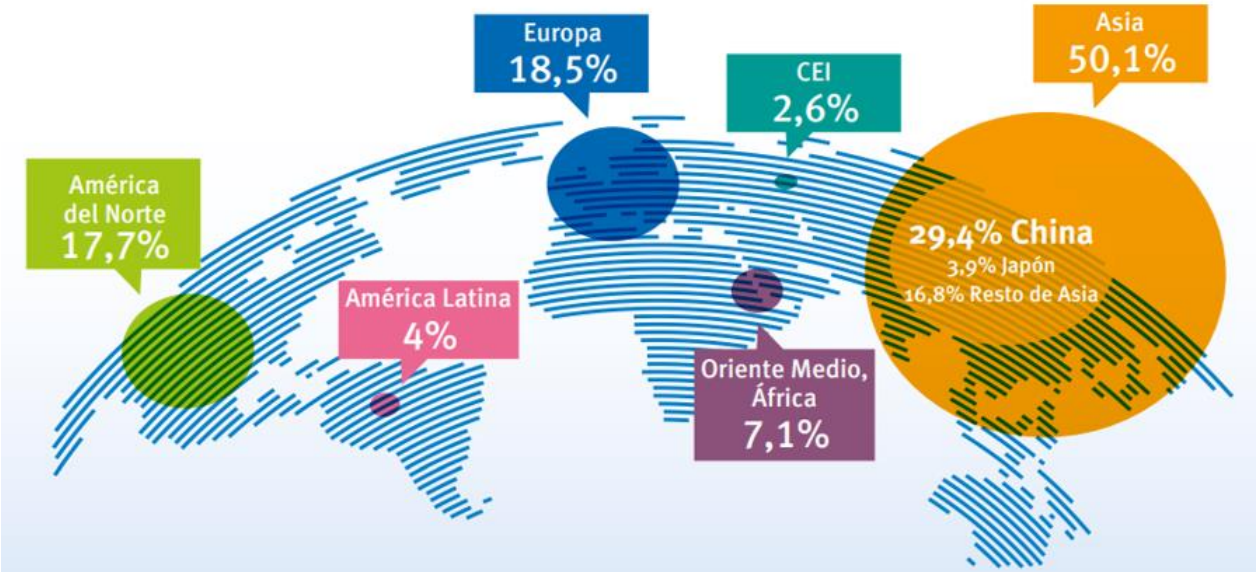

Figura 5. Principales países productores de plásticos a nivel mundial. Principales países y el porcentaje de producción de plásticos del 2018, imagen tomada de mundoplast.

1.2 Nanotecnología y nanopartículas.

La nanotecnología es una ciencia que se encarga de la síntesis, el diseño, la caracterización, la producción, la aplicación y la manipulación de materiales a una escala de aproximadamente 1 a 100 nanómetros (milésima de millón de metro) conocidas como nanomateriales, los cuales poseen características únicas y diferentes a las de los materiales originales de donde provienen. (Castro et al., 2013) (Figura 6)

Debido a las diferentes aplicaciones que les puede dar a los nanomateriales, es de gran importancia evaluar no solo los beneficios, sino también los riesgos potenciales que pueden presentar estos materiales.

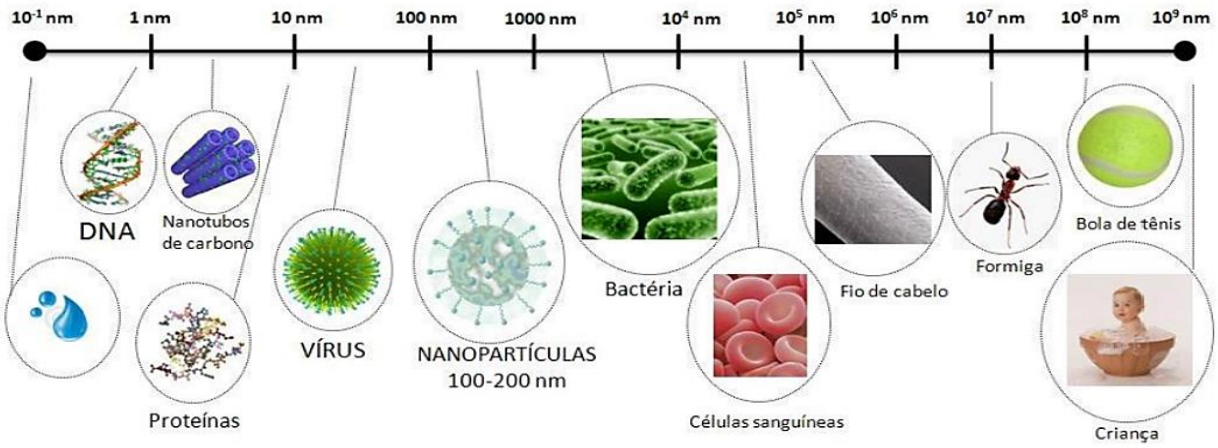

Figura 6. Representación esquemática de la escala nano- micrométrica. Da Cruz, 2015.

1.2.1 Origen de las micro y nanopartículas plásticas.

Las nanopartículas plásticas tienen tres orígenes, las de origen primario, que son todas las partículas fabricadas por las industrias que poseen una aplicación específica. Las de origen secundario, que tiene origen de materiales parentales, por ejemplo, artículos de plásticos desechados y textiles. Y los terciarios, que son todos los materiales que se utilizan para envasar alimentos. (Carbery et al., 2018). Otros autores solo mencionan dos orígenes, el origen primario que viene de la manufacturación de otros materiales a los cuales se les han añadido intencionalmente como las pastas de dientes, mascarillas, los filtros solares, entre otros. En el origen secundario es donde las micro y nanopartículas se forman de una pieza más grande mediante procesos de degradación y fragmentación en el medio ambiente (Christoph et al., 2015).

El proceso donde un macroplástico se degrada en partículas más pequeñas hasta microplásticos empieza con la exposición a la luz ultravioleta (UV), conocida como fotodegradación. Este mecanismo hace que los polímeros sean vulnerables a procesos; como la biodegradación (llevada a cabo por organismos como bacterias, hongos, crustáceos) o procesos mecánicos (por abrasión con el agua, las rocas o la arena) (Wright et al., 2017; Lehner et al., 2019). Se estima que este proceso de degradación y fragmentación puede continuar indefinidamente hasta la formación de lo que hoy conocemos como nanoplásticos. Esta transformación es continua y se lleva a cabo en todos los plásticos, lo que hace que estos estén presentes en casi todos los ambientes que existen en el planeta (Jin et al., 2019).

El término de micropartícula es todo material cuyo tamaño empieza a partir de un micrómetro (Delgado, 2019). En el caso de los microplásticos este terminó fue utilizado por primera vez por Thomsosn y sus colaboradores, y se define como “pequeñas partículas de plástico de <5mm de diámetro (Hirt and Body, 2020). De igual forma el término de nanomaterial o nanopartícula engloba a todos aquellos materiales que por lo menos una de sus caras mida 100 nanómetros (Figura 7).

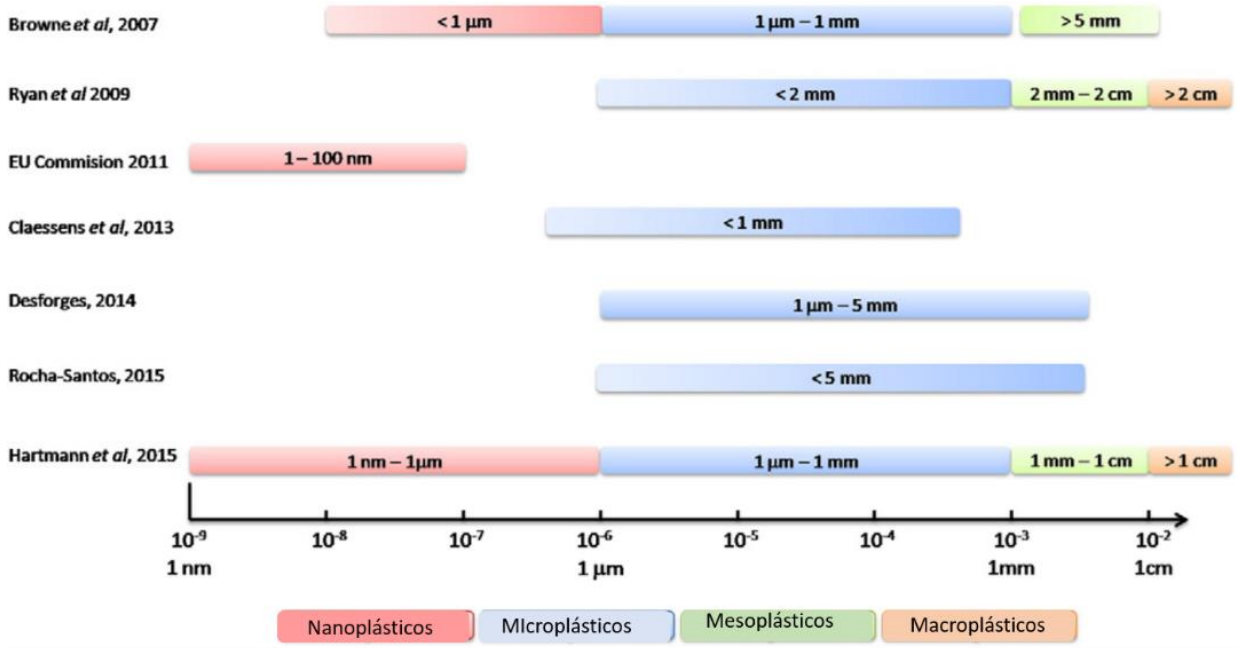

Figura 7. Representación esquemática de los rangos de tamaños y sus nombres propuestos por algunos autores.

Sin embargo, en el caso de las nanopartículas plásticas, su definición no ha encontrado un consenso general, ya que algunos autores mencionan que una nanopartícula plástica es aquella en la cual dos de sus dimensiones miden menos de 100 nm (Klaine et al., 2012), mientras que otros autores como Hartmann et

al (2015), menciona que una nanopartícula es aquella partícula que posee en al menos una de sus caras una dimensión menor de un micrómetro (De Costa, 2016; Gigault et al., 2018). Mientras que la Autoridad Europea de seguridad Alimentaria (EFSA) define a los nanoplásticos como "Un material natural, accidental o manufacturado que contiene partículas en un estado libre, agregado o aglomerado y donde, el 50% o más de las partículas en el tamaño de distribución, una o más dimensiones externas está en el rango de 1 nm -100 nm". (Hirt and Body, 2020)

Sin embargo, en la actualidad no se ha llegado a un acuerdo sobre la definición de microplásticos y nanoplásticos, así como el límite del tamaño, ya que algunos autores mencionan que el límite de los nanoplásticos es 100 nm y otros que es de 1000 nm.

1.2.2 Introducción a la cadena trófica y vías de exposición para el ser humano.

La ubicuidad del plástico en sus diferentes dimensiones hace que estemos en intimo contacto con este sin siquiera imaginarlo. En el caso de las dimensiones micro y nano, las vías de exposición son tan diversas como lo son sus fuentes de producción y origen. Cuando los micro y nanoplásticos se encuentran en un ambiente como las aguas continentales o los océanos, interactuaran con diferentes organismos e incluso pueden ser engullidos o devorados por los consumidores primarios, (zooplancton, microalgas, fitoplancton) el cual sirve como alimento de un sinfín de organismos, como peces, crustáceos, bivalvos, etc. (Christoph et al., 2015; Carbery et al., 2018).

Hasta el momento no se sabe con certeza que sucede con los plásticos dentro de los diferentes organismos, se estima que los micro y nanoplásticos no va a ser degradados, si no que estos se irán acumulando y serán transmitidos entre organismos involucrados en la cadena trófica, llegando así hasta el último consumidor, el hombre (Carbery et al., 2018) (Figura 8). Esta conclusión ha sido desarrollada a partir de las observaciones y estudios en donde se han encontrado micro y nanopartículas plásticas en organismos acuáticos como Dafnia (Carbery et al., 2018) con las dimensiones de 24 nm, otras de alrededor de 5-10 µm en órganos como branquias y en el intestino de cangrejo, así como su acumulación en hígado de pez cebra (Deng et al., 2017).

En referencia con la interacción del ser humano y las micro- nanopartículas plásticas, hasta el momento existen pocos reportes que hablen de los posibles riesgos que pueden causar las micro y nanopartículas

plásticas. Los seres humanos estamos expuestos a las nanopartículas principalmente por tres diferentes vías; la oral, la cutánea y la respiratoria (Lehner et al., 2019). Las fuentes de micropartículas para la vía de exposición por inhalación, se piensa que son la erosión de los neumáticos de caucho, polvo y tejidos sintéticos, en donde los principales polímeros encontrados son poliestireno, polietileno, polipropileno y tereftalato de polietileno. Mientras que las fuentes de micro y nanoplásticos para la exposición vía cutánea o dérmica, es mediante productos que se usan en su mayoría en el ámbito cosmético como: limpiadores faciales, exfoliantes, cremas de afeitar, jabón, desodorantes, sombras de ojos, entre otros productos ya que estos contienen perlas plásticas (Hirt and Body, 2020). Aunque los micro y nanoplásticos están presentes en diferentes ambientes nosotros estamos expuestos principalmente por la vía digestiva u oral.

La exposición asociada a la vía oral se debe al consumo de productos de uso común, en los cuales han sido encontrados micro y nanoplásticos como: agua embotellada en plástico y en vidrio (en donde el principal polímero encontrado es el PET) (Toussaint et al, 2019; Paul B.et al,2020), las pastas de dientes (Lehner et al., 2019), miel y azúcar (Toussaint et al., 2019), cerveza (Toussaint et al., 2019), en la sal de mesa que se usa para cocinar (Revel, 2016; Toussaint et al., 2019) donde fue identificada la presencia de celofán, poliestireno y PET siendo este último el más abundante (Yang, 2015); refrescos, bebidas energéticas, te frío e incluso la leche (donde los polímeros encontrados fueron poliesteracetal, PET, acrilonitrilo butadieno estireno (Paul et al.,2020), en la carne de pollo empaquetado, frutas y verduras, como la manzana (principalmente), zanahoria, lechuga, brócoli, patatas (Paul et a.l,2020).

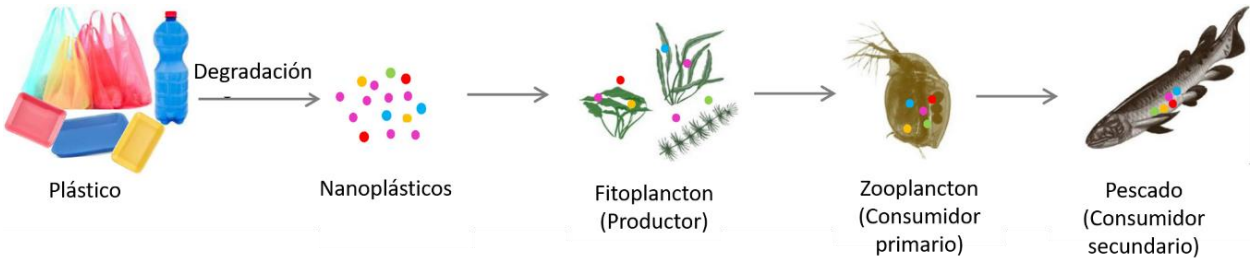

Figura 8. Cadena trófica con las posibles rutas a seguir de los plásticos. Se muestra la formación de las nanopartículas plásticas, las posibles rutas y los posibles organismos con los que tiene contacto durante la cadena trafica en un ambiente acuático salino, imagen tomada y modificada de Kik et al. (2020).

1.2.3 Micro y nanoplásticos en el intestino.

Hasta el momento es muy insuficiente la información que se tiene acerca de los efectos e interacción que tienen las micro y nanopartículas plásticas sobre el tejido intestinal, y los pocos estudios realizados sobre la interacción de las nanopartículas y el sistema digestivo se llevaron a cabo en modelos *in vitro*. Los resultados obtenidos nos pueden dar una pequeña idea acerca del posible daño causado por las nanopartículas plásticas, pero estos resultados no son suficientes para decir como afectarían al ser humano, he incluso muchos de ellos se contradicen a lo que otros estudios dicen.

Como ya se ha mencionado, antes de llegar al intestino las partículas contenidas en los alimentos tiene que atravesar diferentes segmentos del tracto digestivo (Figura 9), los cuales por sus características pueden afectar alguna propiedad de la partícula, o viceversa, podría ser que alguna característica de la partícula pueda influir en su absorción y distribución en los diferentes órganos, como el tamaño y la carga superficial (Acebedo, 2020). Estudios llevados con nanopartículas de poliestireno de 20 y 200 nm, mostraron que es contacto con la saliva formaban agregados principalmente las nanopartículas de 200 nm, sin embargo, no mostraron cambios en cuestión de tamaño. Al momento que las nanopartículas llegan al estómago, se cree que su ambiente ácido, desintegrará a la partícula, sin embargo, la bibliografía menciona que no sufren ningún efecto durante las dos horas de degradación. Al momento de llegar al intestino, las nanopartículas pueden sufrir de aglomeración por estar en contacto con los fluidos intestinales.

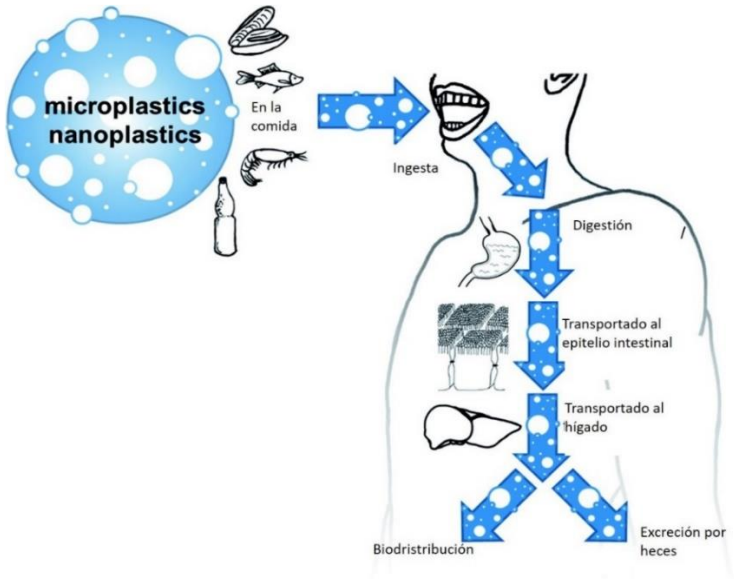

Figura 9. *Exposición humana vía oral y la posible trayectoria de las micro y nanopartículas plásticas. Paul* et al. *(*2020*)*

Los estudios llevados a cabo con líneas celulares principalmente con la línea celular Caco-2, han demostrado que alrededor de las partículas se les forma una corona proteica, la cual puede influir en el proceso de absorción e internalización, y también el destino; de hecho, se piensa que pueden existir posibles escenarios para las nanopartículas al llegar al intestino: 1) que se quede en el lumen, donde podría actuar como irritante del tejido o para liberar sustancias tóxicas. 2) las partículas atraviesan el tejido intestinal hasta llegar al lado basolateral. 3) las nanopartículas permanezcan en el tejido intestinal dentro de las células como lo reportados en Paul et al. (2020).

Varios estudios realizados en diferentes organismos han demostrado que las micro y nanopartículas se pueden absorber o acumular dependiendo del tamaño. Las micropartículas de >150 µm no se absorben permanecen unidas al epitelio, mientras que las partículas de 2 µm pueden lograr atravesar el epitelio, sin embargo, son las partículas más pequeñas las que atraviesan mejor al tejido, por medio de diferentes mecanismos: i) endocitosis, ii) transcitosis, iii) persorción y iv) captación paracelular, llegando a diferentes órganos como; hígado, bazo, corazón, pulmones, riñones e incluso el cerebro (Bouwmeester et al., 2015; Hirt and Body,2020). También la bibliografía menciona que es posible que las partículas dañen la mucosa intestinal, Jin, et al. (2019) menciona que las nanopartículas plásticas pueden provocar una disminución en la capa y segregación de moco (mucina), así como la alteración de los genes relacionados con la segregación de mucina.

La otra ruta es ser expulsado por medio de las heces, en un estudio realizado en China a 26 personas, encontraron que contenían 8 tipos de microplásticos, donde los principales tipos de plásticos encontrados fueron PET, PS y PP (Znag et al., 2021). Otro trabajo parecido fue el de Schwabl et al. (2019), en el cual estudió las heces de 8 voluntarios donde se encontraron partículas de 50 a 500 µm de 9 diferentes tipos de plásticos, siendo el PP y el PET los más abundantes. Debido a la escasa información al respecto, es necesario llevar a cabo experimentos enfocados en analizar con detalle, el efecto de las nanopartículas plásticas en el tejido intestinal.

1.3 Sistema digestivo

1.3.1 Tracto digestivo.

El aparato digestivo es un conjunto de órganos huecos que forman un gran conducto cuyo inicio se encuentra en la boca y su final se encuentra en el ano, este conjunto de órganos posee glándulas asociadas las cuales vierten diferentes secreciones y se encuentran localizadas en las paredes de los diferentes

órganos que conforman el sistema. El aparato está conformado por la boca, la faringe, el esófago, el estómago, los intestinos (grueso y delgado), recto y ano (Figura 10). Las principales funciones del sistema digestivo son la ingesta de alimentos, la digestión y la absorción de nutrientes. (Higashida, 2005) Sin embargo existen órganos que no forman parte del sistema digestivo pero que están involucrados en la digestión de los alimentos, como es el caso de hígado y páncreas (Boticario y Angosto, 2012).

La digestión de los alimentos comienza en la boca donde los alimentos ingeridos son disgregados en partículas más pequeñas, no solo por ser triturados mecánicamente con los dientes, sino también por acción de las enzimas contenidas en la saliva como la amilasa y la lipasa que ayudan a disgregar y al mismo tiempo compactar todo en una masa homogénea llamada bolo alimenticio. Una vez terminado esta parte del proceso, el bolo alimenticio pasa por al esófago por medio de los movimientos de las paredes (movimientos peristálticos) y la gravedad, hasta llegar al estómago el cual tiene como funciones: almacenar los alimentos y líquidos; mezclar alimentos y líquidos con el jugo gástrico (constituido por agua, mucina, ácido clorhídrico y enzimas) donde las proteínas y las grasas (lípidos) serán degradadas con ayuda de las enzimas pepsina y lipasa formando el quimo. Finalmente, el quimo será vaciado lentamente en el intestino (Ross, 2009; Boticario y Angosto, 2012).

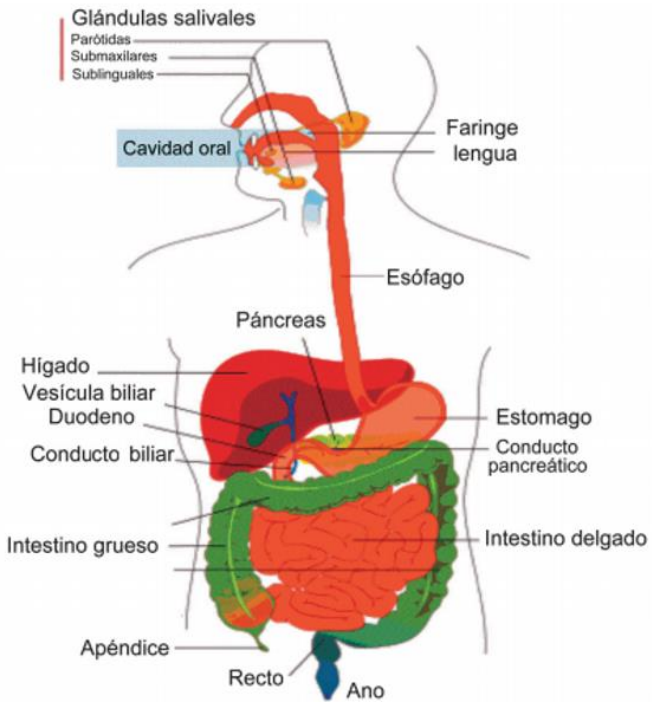

Figura 10. Imagen del sistema digestivo. Imagen de los principales órganos que conforman al sistema digestivo (esófago, estómago, Intestino delgado, Intestino grueso, colon, recto y ano) y órganos secundarios (hígado y páncreas), Boticario y Angosto, 2012.

Una vez que el estómago llevó acabo la degradación de los alimentos a pequeñas moléculas (un ejemplo son las proteínas que se degradan a péptidos), es en el intestino delgado en donde se lleva a cabo el proceso de absorción de nutrientes, aquí los alimentos se combinan con las sales biliares y jugos pancreáticos, los cuales poseen enzimas como la lipasa, amilasa y tripsina. El intestino delgado se divide en tres partes, la parte más cercana al estómago se le conoce como duodeno, y es este lugar donde se lleva a cabo la neutralización del medio acido presente en el estómago por medio de bicarbonato de sodio, en este fragmento actúan enzimas como la tripsina y amilasa. El segundo segmento denominado yeyuno tiene la función de transportar todos los nutrientes e iones a través de sus paredes, en el Ilion se lleva a cabo la reabsorción de las sales biliares y de algunas vitaminas. Y por último es el intestino grueso donde se conserva el sodio y el agua (Boticario y Angosto, 2012). Cabe mencionar que todo el tracto digestivo excepto el estómago, está recubierto por microorganismos, los cuales participan en prevenir enfermedades, ser una barrera contra otros patógenos, mejorar el proceso digestivo, entre otras funciones, de ahí la importancia de tener una dieta buena o consumir probióticos. (Salazar y Montoya, 2003)

1.3.1.1 Microbiota intestinal

El termino microbiota intestinal, hace referencia a la comunidad de microrganismos vivos residentes en el tubo digestivo. Se estima que, en los mamíferos en el intestino grueso, coexisten entre 10^{12} - 10^{14} diferentes tipos de microorganismos en un consorcio altamente organizado (Icaza-Chávez, 2013). En los últimos años se ha comenzado a tomar importancia el papel de estos microorganismos saprófitos en la fisiología y salud humanas, ya que este sistema, ha pasado de ser considerado un comensal acompañante, a un “órgano metabólico”, con funciones en la nutrición, la regulación de la inmunidad y la inflamación sistémica. Se ha visto que el microbiota, en especial en humanos, tiene enzimas digestivas que transforman a los polisacáridos complejos de la dieta en monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta. Así mismo, la flora intestinal parecer tener influencia directa en la permeabilidad y la función de barrera de la mucosa intestinal (Serra, 2016).

1.3.2 Histología del Intestino delgado.

Los diferentes componentes del tracto digestivo poseen una morfología similar desde el esófago hasta el intestino grueso. A lo largo del tubo digestivo se pueden identificar 4 capas: 1) la capa mucosa, 2) la capa submucosa, 3) la capa muscular y 4) la capa serosa.

La capa mucosa puede dividirse en una capa de musculo liso y un revestimiento epitelial y es la encargada de las funciones de absorción y secreción. Para aumentar la superficie de absorción la mucosa forma vellosidades, que son pequeñas prolongaciones digitiformes cubiertas por un epitelio cilíndrico con un borde estriado, está formado por tres tipos de células: a) las de revestimiento que son los enterocitos y coloncitos, que son células cilíndricas con un borde estriado cuya función principal es la de absorción de nutrientes; b) las células calciformes, están encargadas de producir el moco que recubre el intestino y c) las células enterocromafínes o enteroendocrinas, productoras y secretoras de hormonas que van a la lámina y después al torrente sanguíneo (Flores y Aranzábal, 2002;Molina, 2018).

En la base de las microvellosidades intestinales se encuentran las células de Paneth, estas solo se encuentran en la base de las criptas del intestino delgado y tiene forma piramidal, secretan proteínas, enzimas y lisozima (Flores y Aranzábal, 2002).

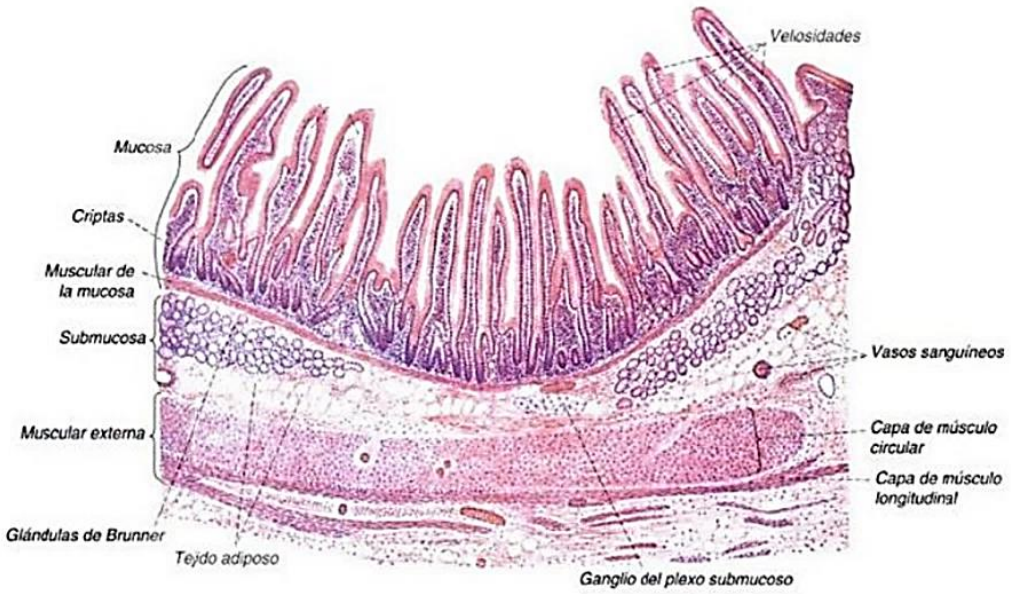

Figura 11. Corte histológico del intestino. Corte histológico donde se señalan las principales capas que conforman el intestino. Molina, 2018.

La capa submucosa está formada por un tejido conjuntivo denso, en algunos puntos puede existir una acumulación de adipocitos. Uno de los principales componentes de esta capa son las glándulas de Brunner, las cuales son productoras de un moco alcalino, es probable que la secreción alcalina reacciones con el ácido clorhídrico formando una sal neutral en el intestino que evita la erosión de la mucosa intestinal (Flores y Aranzábal, 2002; Higashida, 2005), todos estos componentes se pueden apreciar en la Figura 11.

1.3.3 Contracción muscular.

Los músculos son responsables no solo de aquellos movimientos voluntarios sino de aquellos movimientos involuntarios como es el caso de los latidos del corazón, la circulación de la sangre, la circulación de los movimientos digestivos, respiración, secreción de glándulas, etc. (Flores y Aranzábal, 2002). Existen tres tipos de músculos, el primero es el músculo esquelético, los cuales son los músculos unidos a los huesos, este tipo de músculo es el más abundante. El segundo es el músculo cardiaco, es aquel musculo que constituye la pared del corazón. A estos dos tipos de músculos también se les denomina estriados, ya que los filamentos gruesos y delgados forman estrías. El tercer tipo de musculo se le conoce como musculo liso o visceral, se encuentra en las paredes de las vísceras y estas células se presentan lisas, como lo indica la Figura 12.

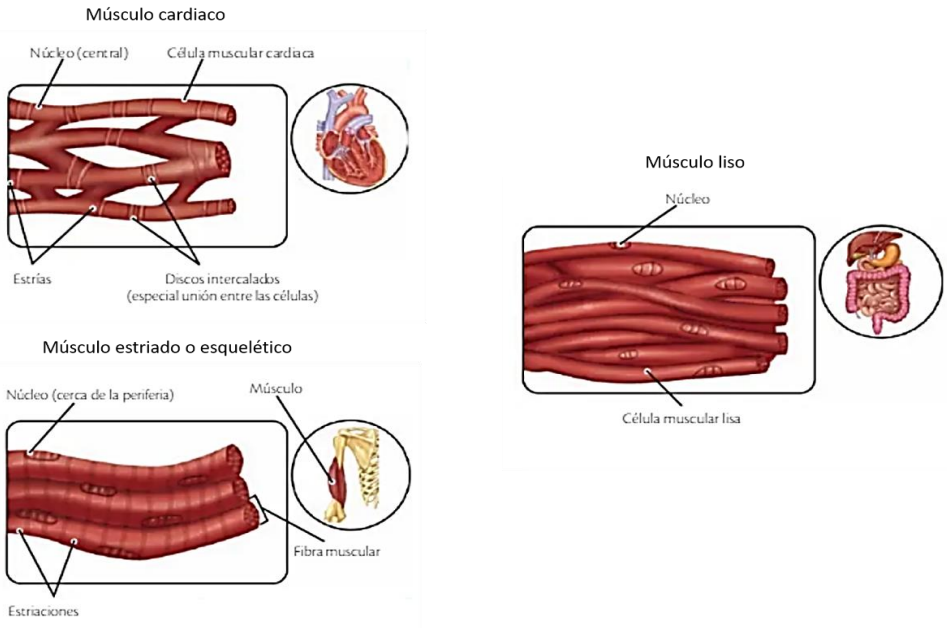

Figura 12. Principales tipos de músculos. Se muestran los tres principales músculos que se pueden encontrar en el cuerpo humano. El músculo esquelético es aquel que se encuentra pegado a la estructura ósea. El músculo liso es aquel que se encuentra en los órganos viscerales y el músculo cardiaco se encuentra en el corazón Higashida (2005*).*

En los músculos estriados la actividad del músculo es posible debido a que está formado de cientos de fibras llamada miofibrillas, las cuales están formadas por unidades llamadas sarcómeros divididos por las líneas Z. Los sarcómeros están compuestos por dos tipos de bandas; las bandas gruesas (filamentos miosina) y las bandas delgadas (filamento de actina), también posen tubos T los cuales se encargan de transmitir las señales se transmitan a todas las miofibrillas y un retículo sarcoplásmico, el cual contiene reservas de calcio. Con ayuda de microscopía se ha podido observar la distribución de las diferentes fibras, y se han establecido zonas y bandas cuyas longitudes cambiaran al momento de llevarse a cabo de la contracción. La banda A se encuentra localizada en la zona centro del sarcómero, esta banda se compone de ambos tipos de fibras, tanto de las fibras gruesas como de las fibras delgadas, al momento de llevarse la contracción muscular esta banda no cambia de longitud. A cada lado de esta banda se encuentra la banda I, la cual está conforma da por filamentos delgados y estas van a cambiar de longitud al momento de llevarse la contracción muscular, este proceso es ilustrado con la Figura 13.

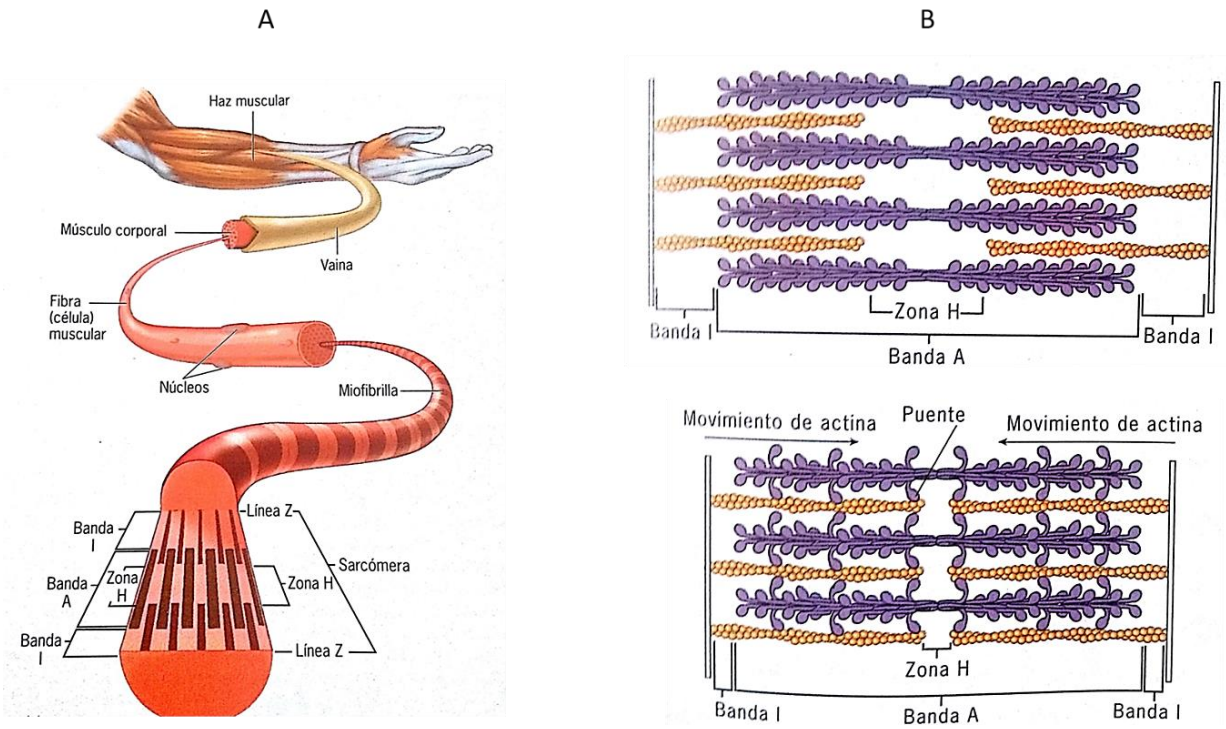

Figura 13. Principales componentes que interviene en la contracción muscular. A. Esquema que muestra los componentes que conforman el musculo estriado, el cual está compuesto por microfilamentos los cuales están formados por sarcómeros, los cuales tienen los filamentos de miosina y actina. B. Ampliación de un esquema que muestra cómo se lleva a cabo el acortamiento de las bandas debido al deslizamiento de los filamentos de actina y miosina. Karp (2013).

En el aparato digestivo, encontraremos músculo estriado solo en el esófago, el cual es un tubo muscular que se continúa con la laringofaringe. Consta de músculo estriado (voluntario) en su tercio superior, una mezcla de liso y estriado en la zona intermedia y músculo liso en el tercio inferior. A partir de este punto y hasta el inicio del esfínter anal, todo el intestino delgado y grueso, están formados por musculo liso.

En el caso del músculo liso visceral el cual se encuentra en el intestino, tanto la anatomía como la fisiología varían un poco. Las células en este tipo de músculo tienen una forma más corta y terminan en puntas, el núcleo se encuentra justo en medio (Figura 14). Los músculos lisos tienen una red de filamentos intermedios no contráctiles, unidos por cuerpos densos (equivalentes a los discos Z) que están esparcido por todo el sarcolema. La contracción muscular se debe a los filamentos gruesos (miosina) que poseen cabezas a lo largo de todo el filamento ya que este tipo de células no contiene troponina y filamentos delgados (actina). A diferencia de la contracción del músculo estriado, el calcio proviene del líquido extracelular y entra al citoplasma, activando las cabezas de miosina, las miosinas activadas forman puentes con las moléculas de actina, y se desplazan una sobre la otra. La forma de relajación de la contracción es la disminución de calcio en el citoplasma.

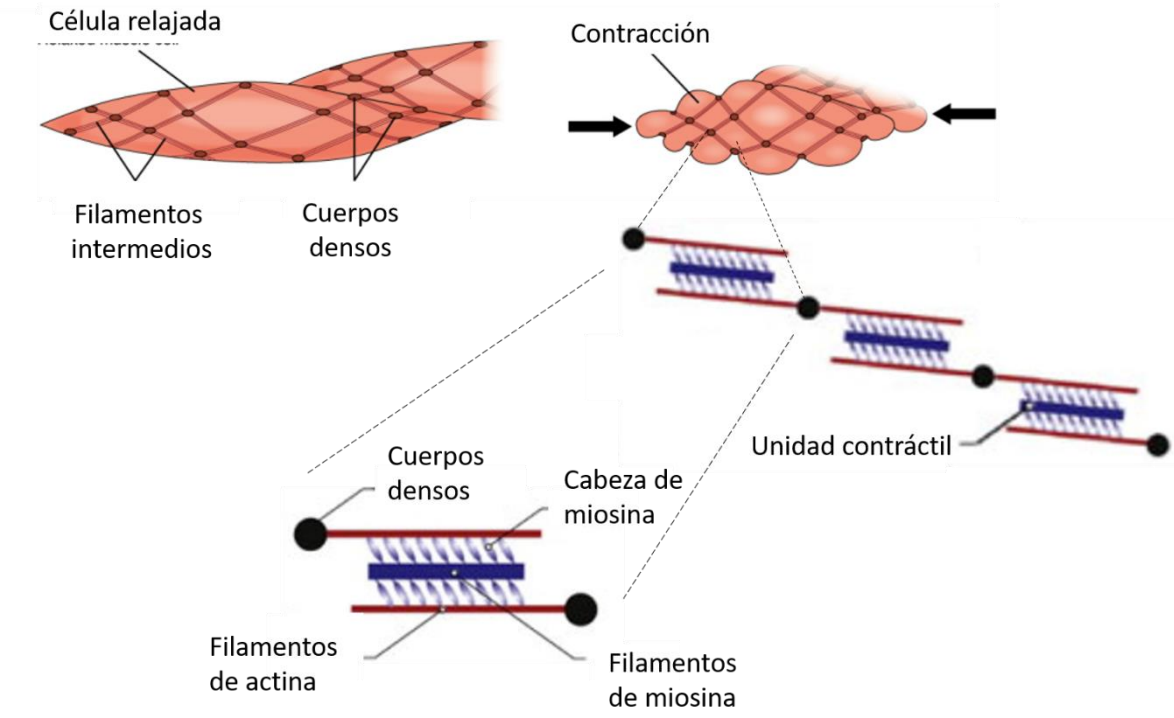

Figura 9. Esquema de la contracción de un musculo liso. Esquema donde se presentan los diversos componentes del musculo liso y como se lleva a cabo el desplazamiento de las fibras de actina y las de miosina para llevar a cabo la contracción. Imagen tomada y modificada de Hafen y Burns (2018) y de Anne y Paul (2013).

1.4 Antecedentes

Como ya se mencionó, existen pocos estudios relacionados con los posibles daños toxicológicos de las nanopartículas plásticas, de acuerdo con Yong et al. (2020), los estudios existentes se realizan en modelos marinos como peces, bivalvos, etc., mientras que los estudios en mamíferos son escasos o los efectos de las nanopartículas no han quedado claros. Según Deng et al. (2017) realizaron estudios con el pez cebra como modelo, demostrando que las nanopartículas plásticas provocan la producción de especies reactivas de oxígeno, inhiben el desarrollo y crecimiento, causan una deficiencia energética, desorden metabólico y genotoxicidad, de igual forma Deng et al. (2017), expusieron ratones con micropartículas de 20 y 5 micrómetros durante 28 días, donde vieron que en ciertos órganos se acumulaban nanopartículas dependiendo del tamaño que estas poseían. En hígado se acumulaban principalmente nanopartículas de 20 micrómetros, en riñón e intestino se acumulaban las de 5 micrómetros. También se vieron daños en los tres tejidos y alteraciones metabólicas. Con estos resultados concluyeron que el tamaño de la partícula influye en la acumulación.

Estos estudios se realizaron con perlas comerciales de poliestireno las cuales están en dimensiones micrométricas, la mayoría de los reportes hasta el momento son de los daños y efectos en estos modelos y sistemas, pero no hay prácticamente ninguno estudio sobre nanopartículas y mucho menos de nanopartículas de PET.

De lo que existe reportado con nanopartículas en diferentes modelos celulares podemos mencionar el caso reportado por Schirinzi et al. (2017). Ellos expusieron dos tipos de líneas celulares (glioblastoma multiforme T98G y carcinoma cervical humano HeLa), a nanopartículas de polietileno (PE) de tamaño de 100 a 600 nm y de poliestireno (PS) con un tamaño de 40-250 nm en diferentes concentraciones, por 24 horas. Sus resultados mostraron que las dos líneas celulares expuestas a poliestireno mostraron un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) principalmente en la concentración de 10 mg/L. Pero fue en la línea celular T98G la que presento mayor expresión de ROS en diferentes concentraciones con los dos polímeros (Figura 15).

De igual forma, Sun et al. (2018) expusieron la bacteria *Halomonas alkaliphila* a PS de diferentes tamaños: 50 y 55 nm (modificado y sin modificar) y 1 micrómetro, por espacio de 2 horas. Sus resultados muestran que las células presentaron un aumento en la expresión de ROS en presencia de las nanopartículas de 55 nm modificadas, seguidas de las 50 nm sin modificar y al mismo tiempo se observaron variaciones morfológicas de las células, como se muestra en la Figura 14. Aunque Lenher et al. (2019), reportaron que

el PET puede liberar toxinas, las cuales pueden causar daños en las células, incremento en la producción de ROS o desencadenar respuestas inflamatorias; aun no existen estudios con nanopartículas de este material que evalúen estas respuestas celulares (Figura 15).

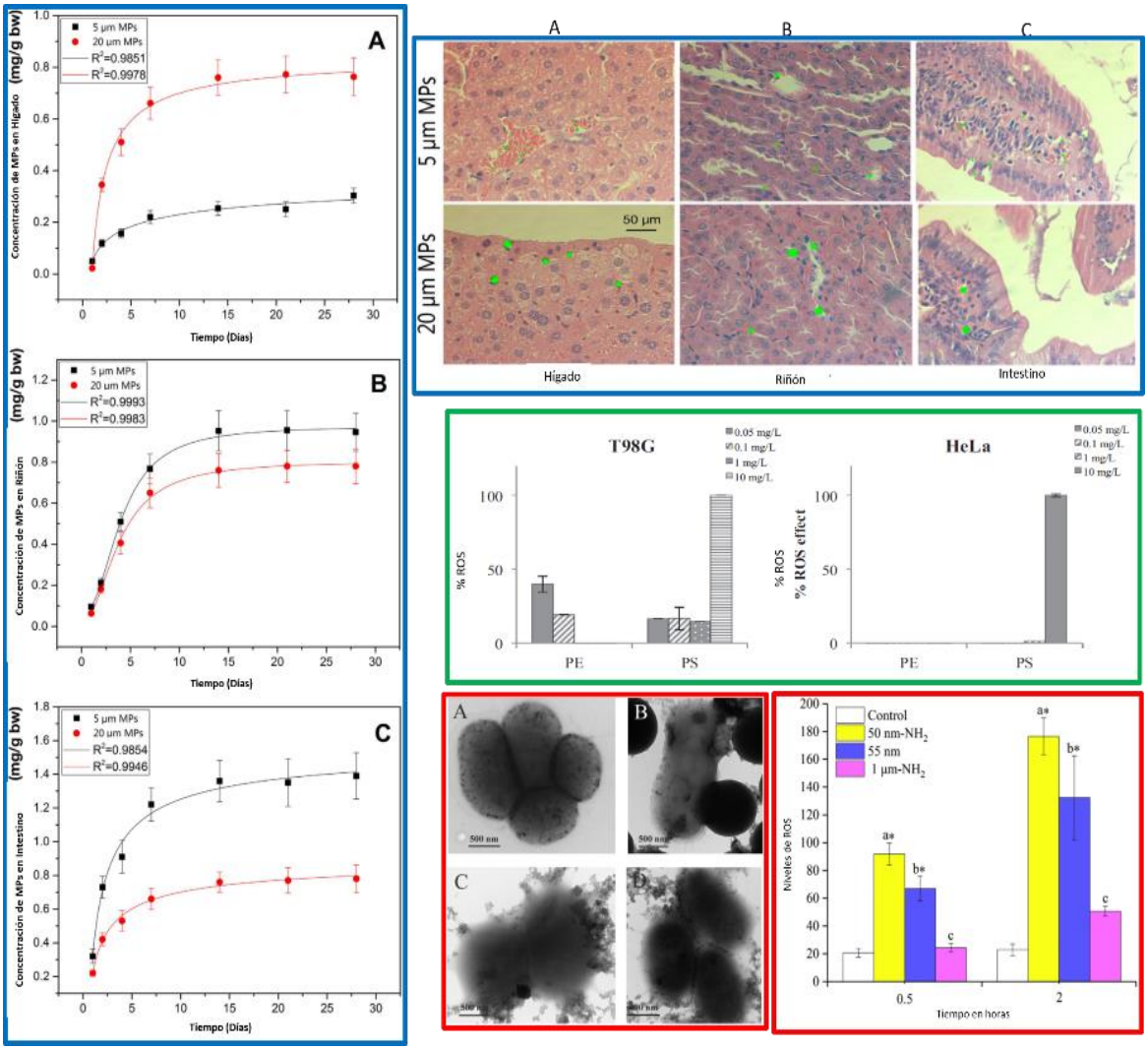

Figura 15. Resultados obtenidos de las diferentes muestras experimentales y las diferentes nano y micromateriales plásticos. (Marco verde) Schirinzi et al. (2017), imagen que muestra el porcentaje de especies reactivas de oxígeno (ROS) presentes en las diferentes líneas celulares expuestas a estos materiales en diferentes tiempos de exposición. (Marco azul) Deng et al. (2017), imágenes que muestran en que órganos se acumulan las micropartículas. (marco rojo) Sun et al. (2018), muestra el porcentaje de ROS presentes en las muestras experimentales des pues de dos horas de incubación, imagen de las células donde se pueden ver modificaciones en la membrana.

1.5 Justificación

Los pocos estudios acerca de las nanopartículas plásticas en particular del PET, su incorporación en la cadena trófica del humano, así como el posible daño asociado a la presencia y posible acumulación de estos en diferentes órganos y tejidos; dejan en evidencia la impostergable necesidad de realizar más estudios de los posibles daños que puedan causar. La presente investigación se enfocará en estudiar las interacciones y los efectos de las nanopartículas de PET al estar en contacto con el tejido intestinal y con diferentes medios, debido a que el ser humano ha estado interactuando con este tipo de nanopartículas de forma involuntaria, sin saber sus efectos hacia la salud. De igual forma también el profundizar en los conocimientos teóricos sobre las interacciones de las partículas y ofrecer una mirada a los posibles daños a la salud.

1.6 Hipótesis

Las nanopartículas de PET alterarán los mecanismos de relajación/contracción del tejido intestinal, el cual podría ser estudiado analizando las variaciones en el tono muscular del tejido intestinal y la interacción de las nanopartículas con fluidos simulados del tracto digestivo.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

Analizar los efectos causados en el tejido intestinal por la exposición de nanopartículas de PET mediante el uso de modelos *ex vivo* de aparato digestivo de roedor.

1.7.2 Objetivos específicos

- Obtener nanopartículas de PET.
- Evaluar la estabilidad de nanopartículas en soluciones simuladas de jugos gástricos.

- Analizar el perfil fisiológico de contracción/relajación del tejido intestinal en presencia de nanopartículas de PET.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Mapa conceptual de la metodología.

Para fines prácticos y con la finalidad de simplificar el procedimiento llevado a cabo en este trabajo de tesis, se esquematiza en un diagrama de flujo, los pasos realizados para el desarrollo experimental (Figura 16).

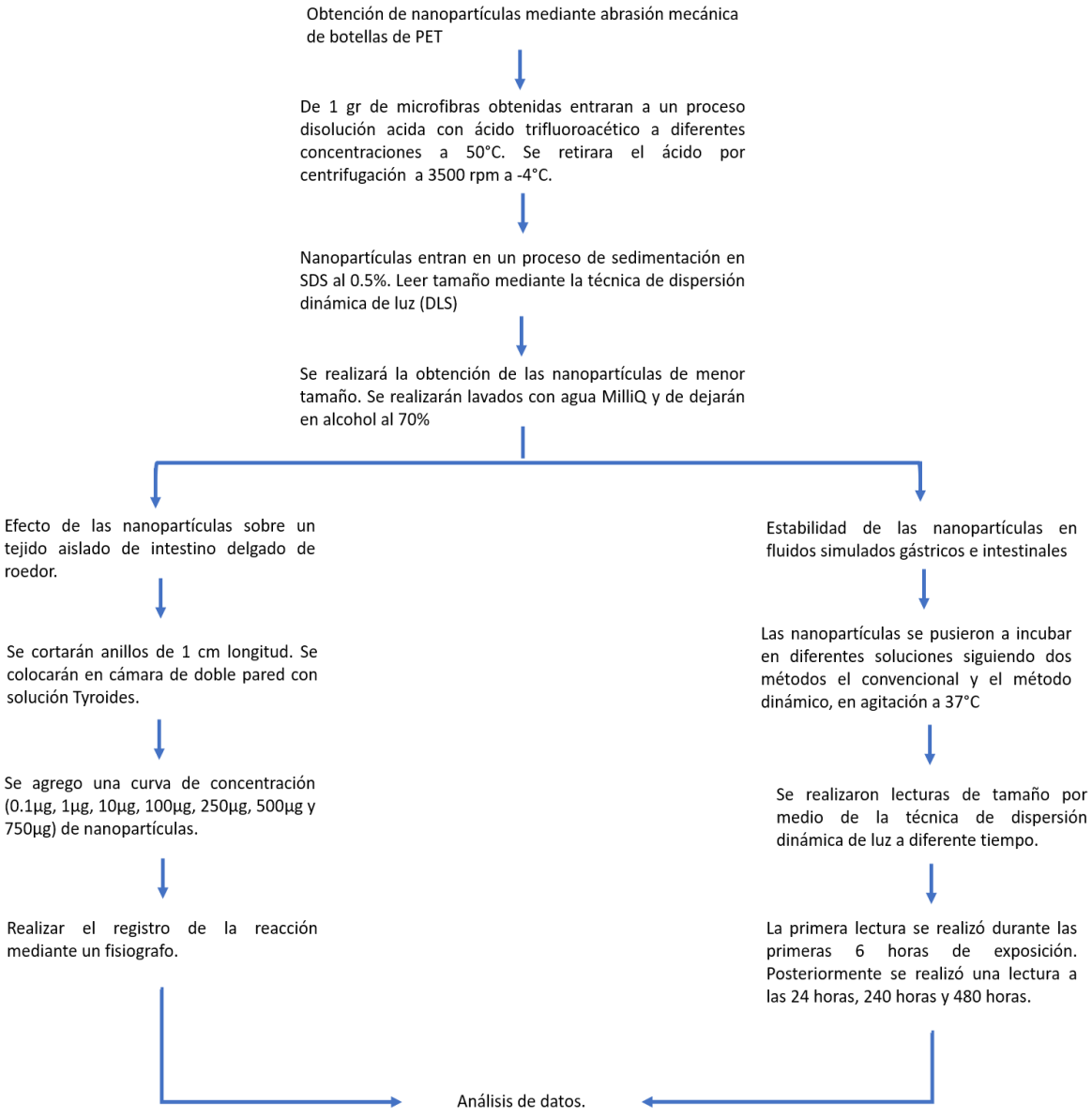

Figura 16. Esquema del plan de trabajo general para este estudio.

2.2 Síntesis de nanopartículas.

Las nanopartículas de PET se obtuvieron a partir de viruta de botellas de plástico producto de una abrasión mecánica. De las microfibras producidas se utilizó un gramo el cual fue disuelto en ácido trifluoroacético (Sigma, Alemania) al 90% a 50°C en agitación por 1 h, transcurrido la hora se eliminó el factor de temperatura para solo dejarlo a temperatura ambiente durante 24 h en agitación constante.

Terminado el lapso de 24 h, se le agregó ácido trifluoroacético al 20% en agitación vigorosa a temperatura ambiente y se mantuvo así por 1 h. El resultado de la disolución y precipitación ácida, se centrifugo a 3500 rpm durante 20 min. a 4°C, con el fin de remover el ácido. Las partículas se colocaron en una solución de SDS (Sigma, Alemania) al 0.5% donde se les realizo un proceso de ultrasonicación con punta durante 10 min. con intervalos de 9 s de sonicación y 9 s de descanso (Ultrasonic homogenizator), para disgregar las partículas aglomeradas como se describe en Rodríguez et al., 2019. Posteriormente las partículas fueron llevadas a un proceso de separación por densidades o separación por sedimentación en una probeta durante 24 h.

Se obtuvieron muestras de los diferentes estratos de la probeta para separar las partículas por tamaño. Para determinar el rango de tamaño de las partículas suspendidas se utilizó la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) (Zeta Sizer, Nanoseries Nono-25, Malvern) y los datos obtenidos fueron analizados por el programa Zetazaizer Sofware.

Una vez determinada la distribución por tamaño y la estratificación, las nanopartículas fueron recuperadas mediante absorción por pipeteo teniendo cuidado de no levantar el sedimento no deseado. Una vez separadas por tamaño las nanopartículas se centrifugarán a 3500 rpm durante 20 min. a 4°C para retirar el SDS. Se les realizó dos lavados con alcohol al 70%, para su almacenamiento y se dejaron en alcohol al 70% hasta su uso.

2.3 Efecto de las nanopartículas plásticas sobre la contracción/relajación del musculo intestinal de rata.

El análisis del efecto que puedan tener las nanopartículas en el tejido intestinal se llevó a cabo mediante la técnica de tejido aislado, la cual está aprobado por el Comité de Ética en Investigación y Docencia (CEID).

Esta técnica tiene en este trabajo la función de medir el tono muscular del tejido intestinal, el cual permite obtener en tiempo real el registro del perfil fisiológico del tejido expuesto a nanopartículas de PET (Figura 26, situada en anexos). Se anestesiaron ratas de la cepa Wistar machos de un peso aproximado entre 350 a 440 g con pentobarbital sódico (40mg/kg) (PiSA, E.E.U.U), para luego ser sometido a una toracolaparotomía (Gage *et al*, 2012), donde se extrajo el corazón y la aorta. Después se realizó un corte longitudinal hasta la parte abdominal para dejar expuestas las vísceras (estómago, intestino delgado, intestino grueso y colón). Se extrajo el intestino delgado completo seccionando cerca del píloro y por encima del inicio del cecum. La sección de intestino delgado, fue colocada en una caja de Petri con solución fisiológica Tyroides, la cual contiene cloruro de sodio (NaCl) 8.5 g (J.T Baker, E.E.U.U), cloruro de potasio (KCl) 0.2 g (HYCEL, México), cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 0.01 g (J.T.Baker, E.E.U.U), cloruro de calcio (CaCl) 0.2 g (J.T.Baker, E.E.U.U), 1.0g de dextrosa (CTR Scientific, México), 0.05 g de fosfato monosodico (NaH_2PO_4) (Analytika, México) y 1.0 g de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) (J.T.Baker, E.E.U.U).

Una vez extraído y colocado en la caja de Petri, se procedió a retirar la grasa, el tejido conectivo y restos de alimentos teniendo cuidado de no dañar el tejido. Una vez limpio el intestino delgado fue colocado en cajas de Petri con solución fisiológica Tyroides limpia para realizar los cortes de los anillos, en segmentos de 1 cm aproximadamente de longitud. Los anillos de intestino fueron colocados en ganchos y puestos en cámaras de vidrio de doble pared con recirculación de agua a una temperatura de 37°C. En la parte interna de las cámaras se adicionaron 16 y 11 ml de solución fisiológica Tyroides, dependiendo de la capacidad de la cámara. Para medir la tensión, uno de los ganchos es fijado al fondo de la cámara, y el segundo es conectado a un transductor cuya señal va directo a un electrofisiografo Grass RPS312 (Astro-Med, Inc. Grass Product Group), el cual a su vez está conectado a una computadora que tiene el programa Grass PolyVIEW, Data Acquisitions y analysis system (Versión 2.2-2.5), que captura y convierte los impulsos eléctricos del transductor en valores de tensión.

El tejido fue tensionado a 1 g/cm² seguido de un periodo de estabilización de 30 minutos, posteriormente a los anillos de intestino delgado se les realizó una prueba de funcionalidad (contracción), por medio de la administración de 35µl de KCl al 4M, con un periodo de observación de 15 a 20 min. Pasado el tiempo se agregaron las diferentes concentraciones de las nanopartículas de Oxido de Titanio (TiO_2) (US Research Nanomaterials Inc.) y las nanopartículas de PET, respectivamente.

Para este ensayo se utilizaron dos grupos de curvas de concentraciones a las que denominaremos como: A) bajas: 0.1 µg/mL, 1µg/mL, 10 µg/mL, 100µg/mL y B) las altas: 200 µg/mL, 500 µg/mL y 750 µg/mL. Entre cada administración se tuvo un tiempo de espera de 15 a 20 min, al final de la administración de las

diferentes concentraciones, se agregó el control de relajación muscular, 35µL Nitroprusiato de Sodio al 70mM (Sigma, Alemania).

Posteriormente se extrajeron los datos en un bloc de notas (archivo txt) y se realizaron las gráficas de la variación en la tensión del anillo intestinal contra tiempo (cada 2 s) con en el programa GraphPad. Se realizó un análisis estadístico por medio de una ANOVA de una vía, de tres ensayos independientes para los diferentes tipos de nanopartículas y para cada grupo de concentraciones (altas y bajas).

2.4 Estabilidad de nanopartículas en diferentes medios gastrointestinales simulados.

Para simular los diferentes ambientes presentes en los segmentos que conforman el tracto digestivo se usaron modelos que generalmente se utilizan para evaluar encapsulados (Juárez y Jiménez,2013). Para este ensayo. se prepararon jugos gástricos e intestinales simulados por dos modelos diferentes, el método convencional y el método dinámico, los cuales se diferencian por la cantidad de ingredientes y por el número de fases, lo que conlleva a un mayor realismo al ambiente intestinal con el que tendrían interacción las nanopartículas.

El método convencional se divide en tres fases diferentes el proceso de la digestión, la primera fase que simula el proceso gástrico se basa en una solución de NaCl con pepsina y lipasa en un pH 2. La segunda, es la fase entérica y contiene una solución a base de glucosa y extracto de levadura a un pH de 6, mientras que la última fase denominada entérica final es la misma solución que la fase entérica solo que con un pH de 7.

Mientras que el método convencional para la simulación de la fase gástrica fue utilizada una mezcla con peptona, mucina, celulosa, etc., a un pH 2. Para la fase entérica se utilizó una solución de bicarbonato de sodio, con lipasa y un sustituto de sales biliares. Para mejores referencias del contenido se muestran las tablas 1 y 2.

A estas soluciones se les agrego 20 µl de nanopartículas por mililitro (100µg de nanopartículas por mililitro), las cuales se incubaron a 37 °C en agitación constante (200 rpm). Para observar la interacción de las nanopartículas con el medio que la rodea se tomaron muestras cada 2 h de incubación iniciando

desde el tiempo 0, 2, 4 y 6 h. De igual forma se realizó una lectura de tamaño a las 24 h, y para terminar se realizó una toma de lecturas a los 10 y 20 días.

Tabla 1. Componentes de las soluciones simuladas para cada segmento del tracto digestivo del modelo convencional.

Modelo convencional.	
Fase gástrica pH 2	
	g/ L
Cloruro de sodio	2
Pepsina	3
Lipasa	0.0009
Fase entérica pH 6 *	
Dextrosa	10
Extracto de levadura	5
Fase entérica final pH 7*	
Dextrosa	10
Extracto de levadura	5
* Se realizo una versión con probióticos sustituyendo al extracto de levadura manteniendo las concentraciones y el pH	

Tabla 2. Componentes de las soluciones simuladas para cada segmento del tracto digestivo del modelo dinámico.

Modelo dinámico	
Fase gástrica pH 2	
	g/ L
Almidón	3
Pectina	2
Mucina	4
Probióticos	1
Extracto de levadura	3
Peptona	1
Dextrosa	0.4
Cisteína	0.5
Celulosa	1
Fase intestinal pH 6	
Bicarbonato de sodio	2.4
Lipasa	0.18
Ácido Ursodeoxicólico	0.5

Capítulo 3. Resultados

3.1 Obtención de nanopartículas PET.

Como ya se mencionó anteriormente en materiales y métodos, la viruta que fueron disueltas por ácido y precipitadas, que resultó en la obtención de una mezcla heterogénea, la cual por medio de la sedimentación en probeta (estratificación) con 0.5% de SDS, permitió separar las partículas por tamaños. En los diferentes estratos formados fue posible encontrar la presencia de dos diferentes intervalos de diámetro hidrodinámico (d.nm): micropartículas y nanopartículas. Las partículas más grandes encontradas en la probeta poseían dimensiones que iban de los 700 nm a los 1110 nm (1 micra), mientras el rango de tamaño de la partícula más pequeña se encontró entre los 60 nm y 200 nm, como se ve ilustrado en la figura 17.

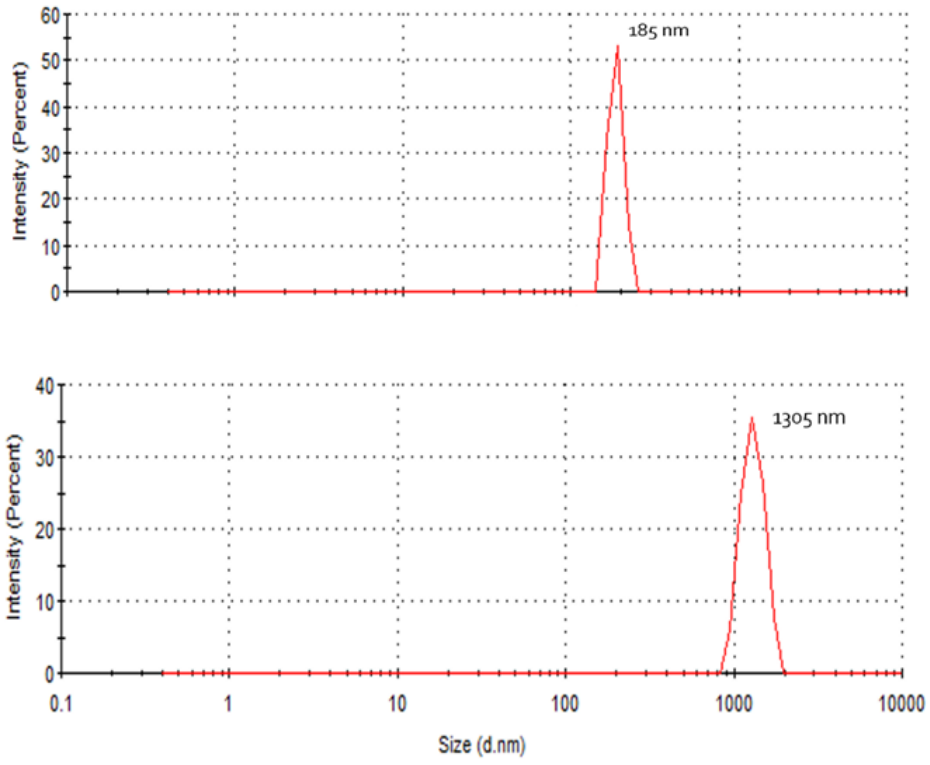

Figura 17. Tamaño de las partículas presentes en la mezcla heterogénea. Ambas graficas representan los dos tipos de tamaños presentes en el proceso de sedimentación. En la gráfica superior se muestra un tamaño nanométrico mientras que en la gráfica inferior se encuentra un posible tamaño micrométrico presente en la mezcla.

Con el fin de averiguar la cantidad aproximada de nanopartículas que se pudieron obtener mediante este proceso de síntesis, las nano y micropartículas obtenidas se secaron y se pesaron. Del 100 % del material que se usó inicialmente para la síntesis, aproximadamente el 28% de las partículas obtenidas tiene un tamaño que va de 600nm-1800nm, mientras que el 67% aproximadamente tienen un rango de tamaño que va de los 50nm a 200nm, el otro 15% se pierde durante el proceso.

3.2 Efecto de las nanopartículas plásticas sobre la contracción del músculo liso de segmentos aislados intestinales de rata.

En las Figuras 18 y 19 (concentraciones bajas y altas respectivamente), se presentan los perfiles fisiológicos representativos de cada condición estudiada con su respectivo control de óxido te titanio (TiO_2). A simple vista es posible observar un perfil similar entre ambas concentraciones (altas y bajas), tanto del tejido en presencia con nanopartículas de PET como del tejido en presencia de las nanopartículas de TiO_2. Sin embargo, si se realiza una comparación entre los perfiles fisiológicos de los tejidos en presencia de nanopartículas de PET y aquellos tejidos en presencia de nanopartículas de TiO_2 se puede observar claramente una diferencia, en el nivel de tensión mostrado en las lecturas.

En el perfil fisiológico de las concentraciones bajas que van de 0.1 a 100 µg/mL, al principio de cada perfil se vio un periodo de estabilidad después de tensionar el tejido con un gramo, el cual es el periodo en donde no se ha realizado ningún estímulo. Posteriormente se observa un incremento en los valores de tensión, que corresponde con el momento de la administración de los estímulos al tejido, ya que al momento de suministrar el cloruro de potasio (KCl), la administración de las diferentes concentraciones de nanopartículas de PET y de nanopartículas de TiO_2, se evidencian en el perfil (indicado por una flecha), como una alteración en forma de pico presente en el registro (Figura 18).

Se observa con claridad el momento de la administración del KCl, ya que corresponde con el primer incremento en la tensión del tejido, con una disminución en la tensión hasta su estado de estabilización. En el caso de las nanopartículas de PET, podemos observar que, una vez administradas las diferentes dosis, existe un ligero, pero constante incremento en la tensión del tejido desde 0.1 hasta 10 µg/mL. Contrario a lo que esperaríamos, con la siguiente concentración (100 µg/mL) la tensión disminuyó y la misma tendencia se observó con la administración de nitroprusiato de sodio, utilizado como vasodilatador y como estímulo que produce el relajamiento del musculo liso.

En el caso de las nanopartículas de TiO_2, se puede observar que la contracción se mantuvo prácticamente igual y con una tendencia constante en todas las concentraciones de nanopartículas una vez pasado el periodo de estabilización por la administración del KCl. De igual manera que el ensayo anterior, la última dosis colocada en la solución fue el fármaco nitroprusiato de sodio (Figura 18).

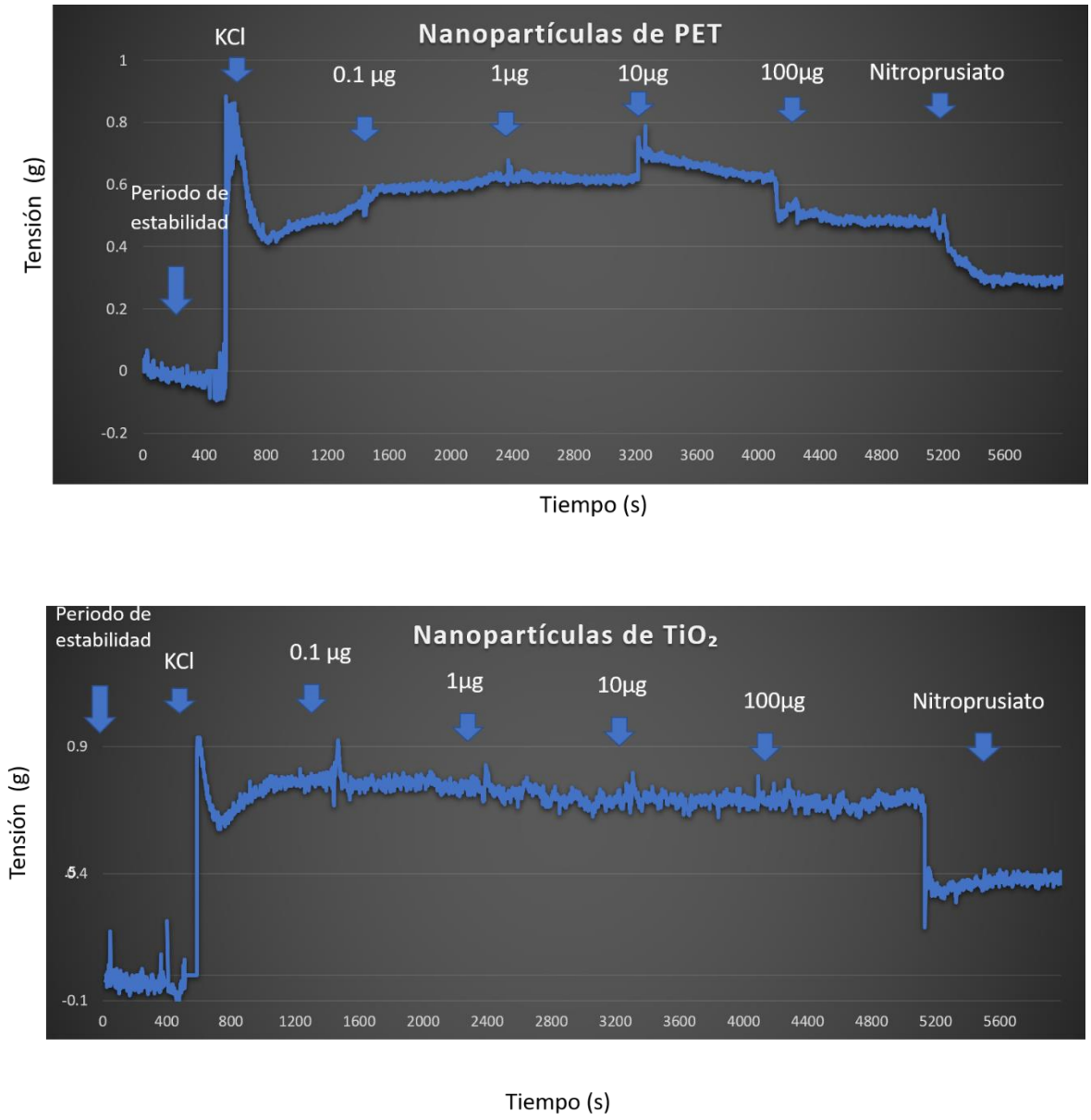

Figura 18. Perfil fisiológico de las concentraciones bajas. En la parte superior está el perfil fisiológico del tejido en contacto con las nanopartículas de PET, donde se observa que se mantiene la tensión del tejido durante las diferentes administraciones de nanopartículas. En la parte inferior está el perfil fisiológico representativo del tejido que estuvo en contacto con las nanopartículas de TiO_2, donde se ve que existe una relajación por parte del tejido una vez administrado el nitroprusiato de sodio.

En este caso, podemos ver que el efecto relajante del nitroprusiato de sodio es más evidente en los tejidos con TiO_2 de dosis bajas, ya que, una vez administrado el fármaco, la tensión constante debido a las nanopartículas, disminuyo prácticamente a la mitad, tomando como referencia el estado de estabilidad y el momento de la administración (Figura18).

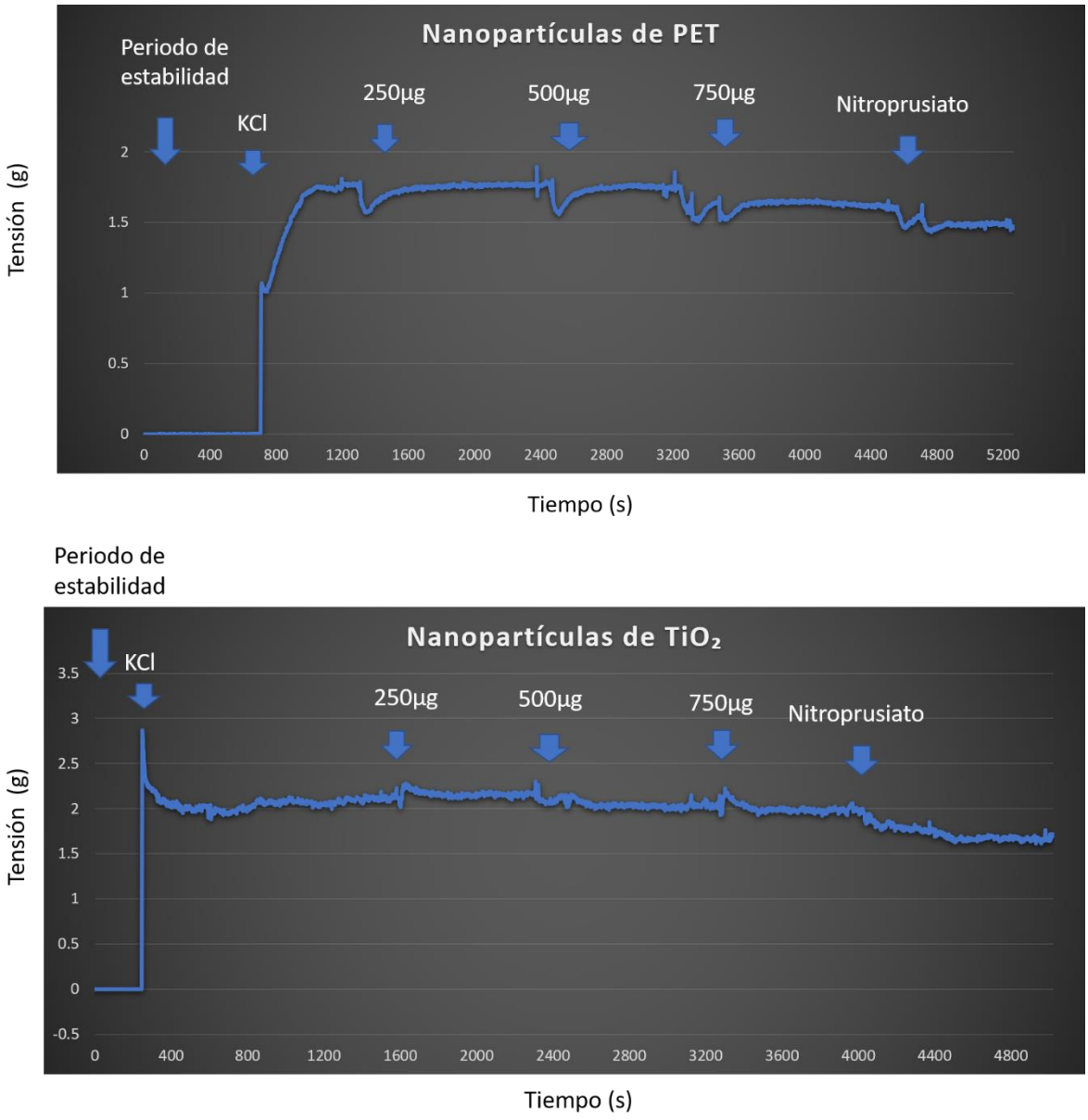

Figura 19. Perfil fisiológico de las concentraciones altas. En la parte superior se encuentra el perfil fisiológico del tejido en contacto con las nanopartículas de PET, en donde se pueden observar los diferentes momentos de las administraciones y la tensión constante, que se traduce como una estabilidad en la contracción. En la parte inferior se encuentra el perfil fisiológico representativo del tejido que estuvo en contacto con las nanopartículas de TiO_2, donde se observa que el tejido no se relajó después de la administración del nitroprusiato de sodio ya que la tensión prácticamente fue la misma que la registrada cuando el tejido fue expuesto a las administraciones de calta concentración de nanopartículas de PET, lo cual se traduce como falta de relajación.

Por otro lado, los análisis de los registros fisiológicos de los tejidos en presencia de concentraciones altas (250, 500 y 750 µg/mL), mostraron diferencias en los perfiles en comparación con las dosis bajas, en la respuesta de contracción/relajación de los tejidos tanto en presencia de PET como de TiO_2 (Figura 19).

En ambos casos, se observó que el tejido expuesto a las concentraciones altas de nanopartículas mantuvo constante los valores de tensión alcanzada con después de la administración del KCl. Cabe destacar que estos valores fueron iguales con todas las diferentes concentraciones de nanopartículas, tanto de PET como de TiO_2 y que la administración del nitroprusiato de sodio, no mostro tener efectos en la relajación del tejido ya que, en ambos casos, la tensión fue constante incluso después de haber administrado una segunda dosis del fármaco (Figura 19).

Un análisis más detallado de los perfiles fisiológicos, tanto de las concentraciones bajas como las concentraciones altas se realizó para determinar el nivel de contracción de tejido durante todo el ensayo, el cual permitió observar con claridad este fenómeno (Tabla 3 y Figuras 20 y 21).

Tabla 3. Porcentaje de contracción del tejido al estar en contacto con las concentraciones bajas y altas.

Porcentaje de contracción			
Concentraciones bajas			
PET		**TiO_2**	
KCl (4M)	*100 ± 0*	*KCl (4M)*	*100 ± 0*
0.1 µg/mL	122 ± 16	01 µg/mL	106 ± 32
1 µg/mL	119 ± 16	1 µg/mL	99 ± 29
10 µg/mL	132 ± 22	10 µg/mL	101 ± 29
100 µg/mL	110 ± 24	100 µg/mL	98 ± 54
Nitroprusiato de sodio (70mM)	99 ± 36	Nitroprusiato de sodio (70mM)	64 ± 32
Concentraciones altas			
KCl (4M)	*100 ± 0*	*KCl (4M)*	*100 ± 0*
250 µg/mL	136 ± 39	250 µg/mL	114 ± 11 (*)
500 µg/mL	118.2 ± 9	500 µg/mL	114 ± 14 (*)
750 µg/mL	113 ± 11	750 µg/mL	111 ± 16
Nitroprusiato de sodio (70mM)	101 ± 17	Nitroprusiato de sodio (70mM)	96 ± 7
(*) Diferencias significativas al compararse contra el control (KCl)			

En el caso de las concentraciones bajas, tanto en presencia de PET como de TiO_2 (Fig. 20), aunque los valores de tensión (media y desviación estándar) obtenidos no muestran diferencias significativas (Fig. 20-A y B); al ser transformados como porcentaje de contracción, podemos observar un incremento en los valores, específicamente en los tejidos expuestos a concentraciones de 0.1, 1 y 10 µg/mL de nanopartículas de PET ($p<0.05$) como se observa en la figura 20-C. Además, se aprecia que la tensión

(Figura 20-A) y el porcentaje de contracción (Figura 20-C) no lograron disminuir al administrar el nitroprusiato de sodio, manteniendo los mismos niveles que los alcanzados al momento de administrar el KCl (como parámetro de comprobación de la viabilidad del tejido), la cual establecimos como la tensión inicial y el 100% de contracción del tejido.

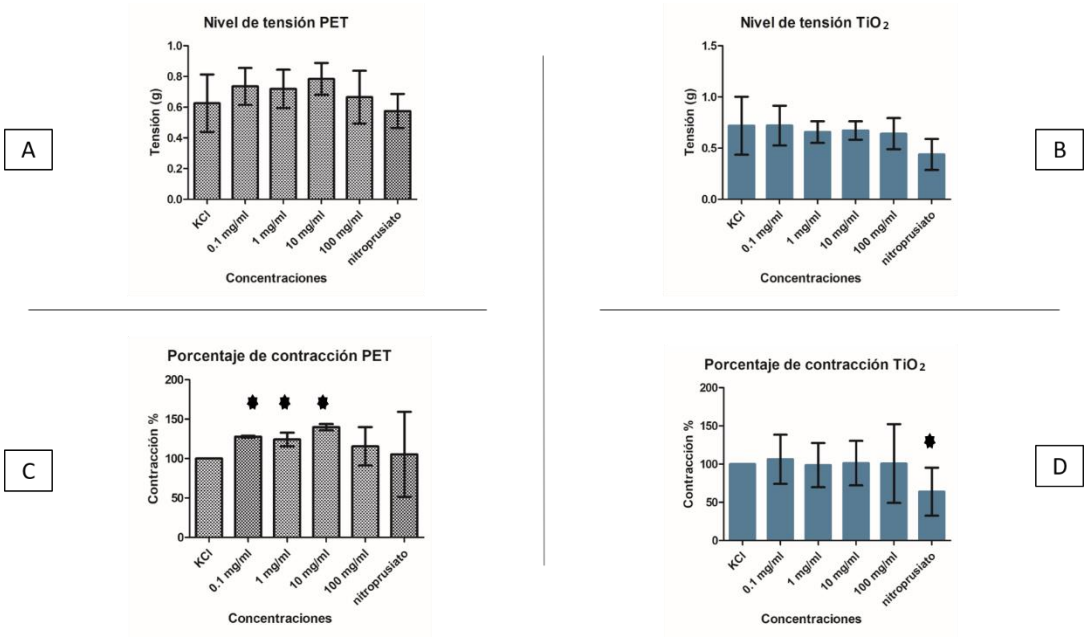

Figura 20. Representación gráfica del nivel de tensión y nivel de contracción de las concentraciones bajas de las diferentes nanopartículas. En el caso de los tejidos en presencia de nanopartículas de PET; tanto los niveles de tensión (A) como los niveles de contracción (C) mostraron que el tejido no se relajó, ya que mantienen la contracción a pesar de la presencia del fármaco nitroprusiato de sodio. En el caso del TiO_2 se aprecia que los niveles de tensión (B) y contracción (D) tienen un ligero incremento en las administraciones de nanopartículas de TiO_2, pero que, al momento de la administración del nitroprusiato de Sodio, este logra una disminución significativa en los niveles de tensión y contracción, lo que se traduce como un proceso de relajación. Los valores presentados son medias ⊥ σ (n=3) *p <0.05 versus control (KCl).

En el caso de las nanopartículas de TiO_2, podemos observar que no existe variación tanto en los valores de tensión (Fig. 20-B) como en el porcentaje de contracción (Fig. 20-D) desde la administración del KCl, hasta las administraciones de las diferentes concentraciones de TiO_2. Sin embargo y contrario a lo observado con el PET, existe una disminución tanto de los niveles de tensión como del porcentaje de contracción, al momento de la administración del nitroprusiato de sodio (Figura 20-B y D).

En el caso de las concentraciones altas, podemos observar que, para las nanopartículas de PET, la tensión (Figura 21-A) y el porcentaje de contracción (Figura 21-C) mostraron un incremento al momento de la administración de la primera concentración (250 µg/mL). Sin embargo y aunque los valores de la media

muestran una ligera disminución, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($p>0.05$) con las siguientes administraciones. Además, que la administración del nitroprusiato de sodio no redujo la tensión del tejido, ya que mantiene los mismos valores que al principio del ensayo, cuando se administró el KCl (Figura 21 A y C). Al mismo tiempo, podemos observar que en el caso del TiO2, tanto la tensión (Figura 21-B) como el porcentaje de contracción (Figura 21-D) se mantuvieron constantes desde la primera administración de nanopartículas, hasta la administración del nitroprusiato de sodio.

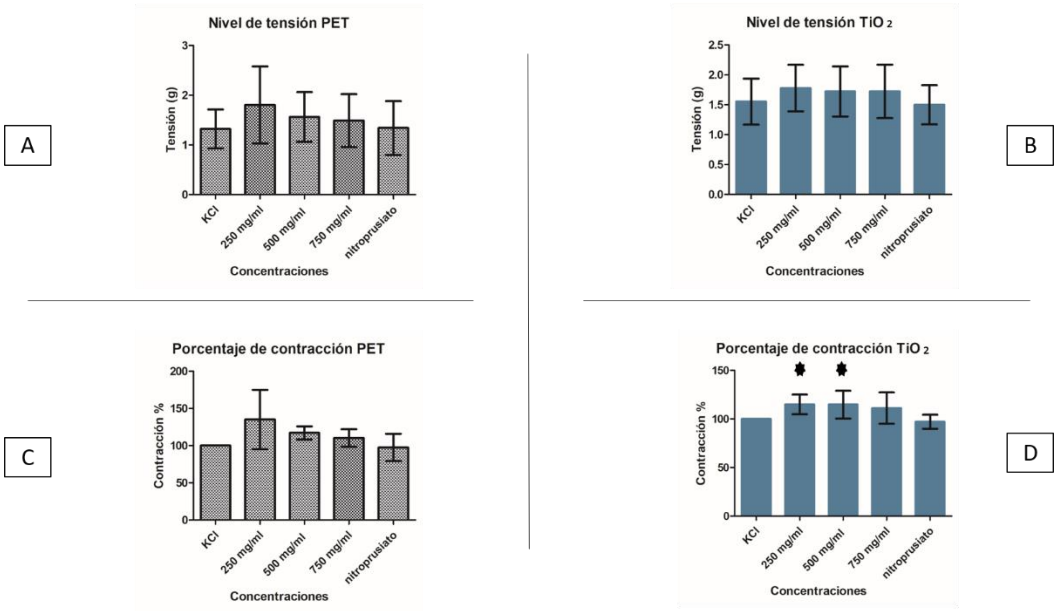

Figura 21. Representación gráfica del nivel de tensión y nivel de contracción de las concentraciones altas de las diferentes nanopartículas. En el caso de los tejidos en presencia de nanopartículas PET, tanto el nivel de tensión como el nivel de contracción muestran, que el tejido responde a la concentración de 250µg y con cada administración, los niveles descienden ligeramente. Sin embargo, esta contracción prácticamente no disminuye después de la administración del nitroprusiato de sodio, lo que se traduce como una contracción mantenida similar a las obtenida con el KCl. En el caso del TiO_2 se aprecia que los niveles de tensión y contracción del tejido, tiene un ligero incremento al momento de las administraciones de nanopartículas de TiO_2 pero que, al momento de La administración de nitroprusiato de sodio, no existe una disminución en los niveles de tensión y contracción similar a lo observado con las nanopartículas de PET. Los valores presentados son medias ⊥ σ (n=3) *p <0.05 versus control (KCl)

3.3 Estabilidad de nanopartículas de PET en fluidos simulados de jugo gástrico e intestinal.

Para estos experimentos se utilizaron dos tipos de métodos de fluidos simulados: los convencionales y los dinámicos. Como ya se mencionó la diferencia de estos dos métodos son los elementos que contienen; ya que el método dinámico contiene más materia orgánica debido a la presencia de celulosa, probióticos, más enzimas, antioxidantes, etc. De igual forma se llevó acabo el análisis de la estabilidad dimensional y

el potencial zeta de las nanopartículas de PET en las soluciones tyroides y sus diferentes modificaciones (que incluyen al nitroprusiato de sodio y al cloruro de calcio), Cloruro de calcio y Cloruro de potasio; por medio de la técnica de DLS.

Los datos obtenidos fueron graficados (media y desviación estándar) en función del tiempo de incubación de las nanopartículas con los diferentes medios. Las gráficas de diámetro hidrodinámico y de potencial zeta, mostraron un comportamiento similar entre algunos medios, por lo que podemos decir que se obtuvieron dos grupos de gráficas. El primer grupo correspondió a las nanopartículas que estuvieron en contacto con medios ricos en electrolitos (CaCl, KCl, solución tyroides y sus respectivas combinaciones) las cuales serán identificadas con las letras A, B, C, D y E en las Figuras 22 (diámetro hidrodinámico) y 23 (potencial zeta). El segundo grupo perteneció a los medios con mucha materia orgánica, identificados con las letras A, B, C, D, E, F y G en las figuras 24 (diámetro hidrodinámico) y 25 (potencial zeta).

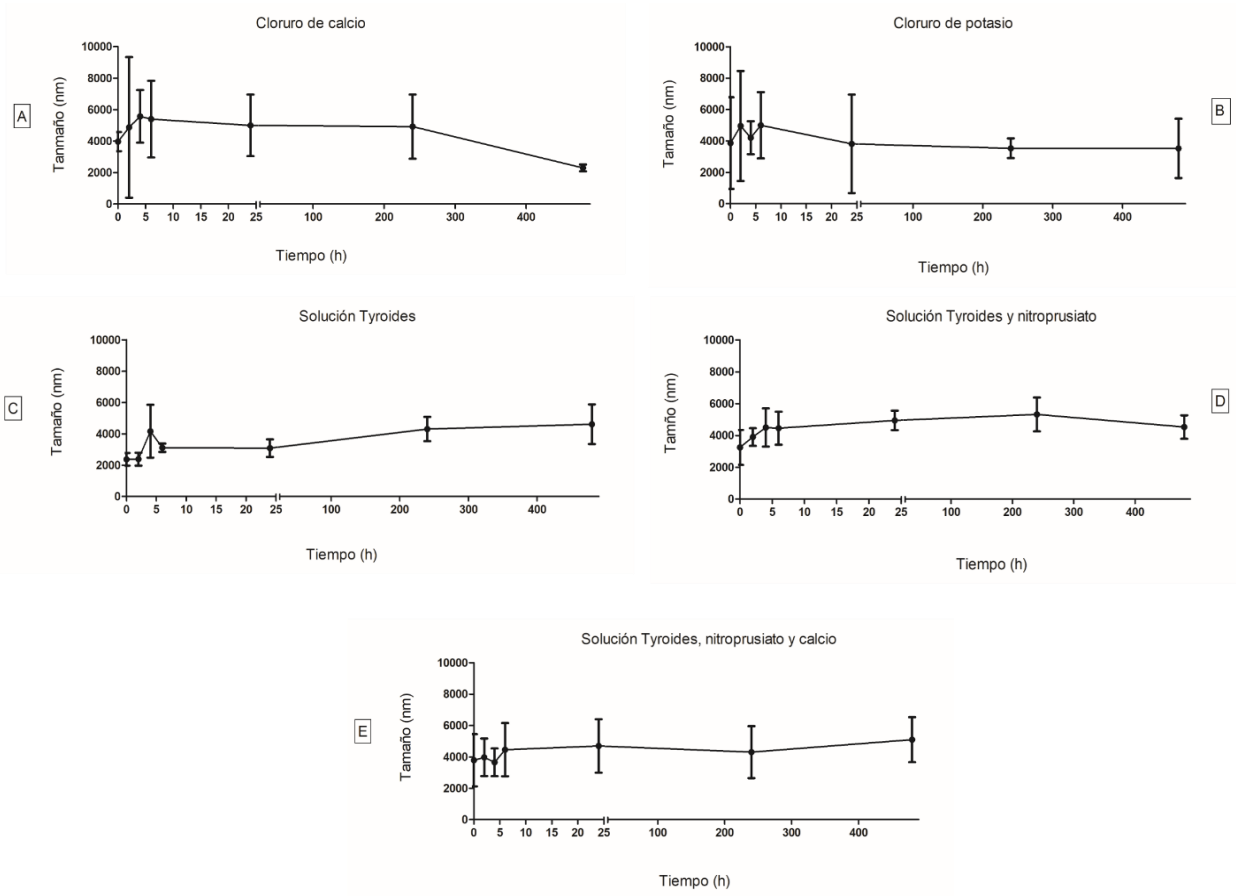

Figura 22. Graficas del diámetro hidrodinámico (d.nm) de las nanopartículas de PET al estar expuesta a medios ricos en electrolitos. Las gráficas muestran el incremento de tamaño sufrido por las nanopartículas en medios ricos en iones y aniones, este incremento de tamaño se ve desde el tiempo 0 hasta el día 20.

El primer grupo de graficas (medios ricos en electrolitos) de manera general, mostraron un incremento en el diámetro hidrodinámico (d.nm) desde el tiempo cero, con dimensiones mayores a 2 micrómetros en todos los casos (Figura 22). Este incremento en el tamaño está asociado a las agregaciones de las nanopartículas por la interacción con los componentes del medio, de casi el doble al tamaño inicial desde el tiempo 0 hasta las 24 horas. Al pasar los 20 días el tamaño se mantuvo constante en la mayoría de las muestras; sin embargo, en el caso de aquellas partículas que estuvieron en contacto con el cloruro de calcio (Figura 22-A) el tamaño disminuyo considerablemente aproximadamente en los últimos 10 días, hasta alcanza un tamaño de 300 nm aproximadamente como se puede observar en la Figura 22.

Al analizar los resultados del potencial Z de las muestras antes mencionadas, observamos que desde el tiempo cero se obtuvieron valores cercanos al 0 en todos los medios (Figura 23), a tal grado de que algunos valores estaban sobre el eje “X” de la gráfica, como fue el caso de la muestra Tyroides (C) y sus derivados [Tyroides/nitroprusiato (D) y Tyroides/nitroprusiato/calcio (E)] como se puede observar en la Figura 23.

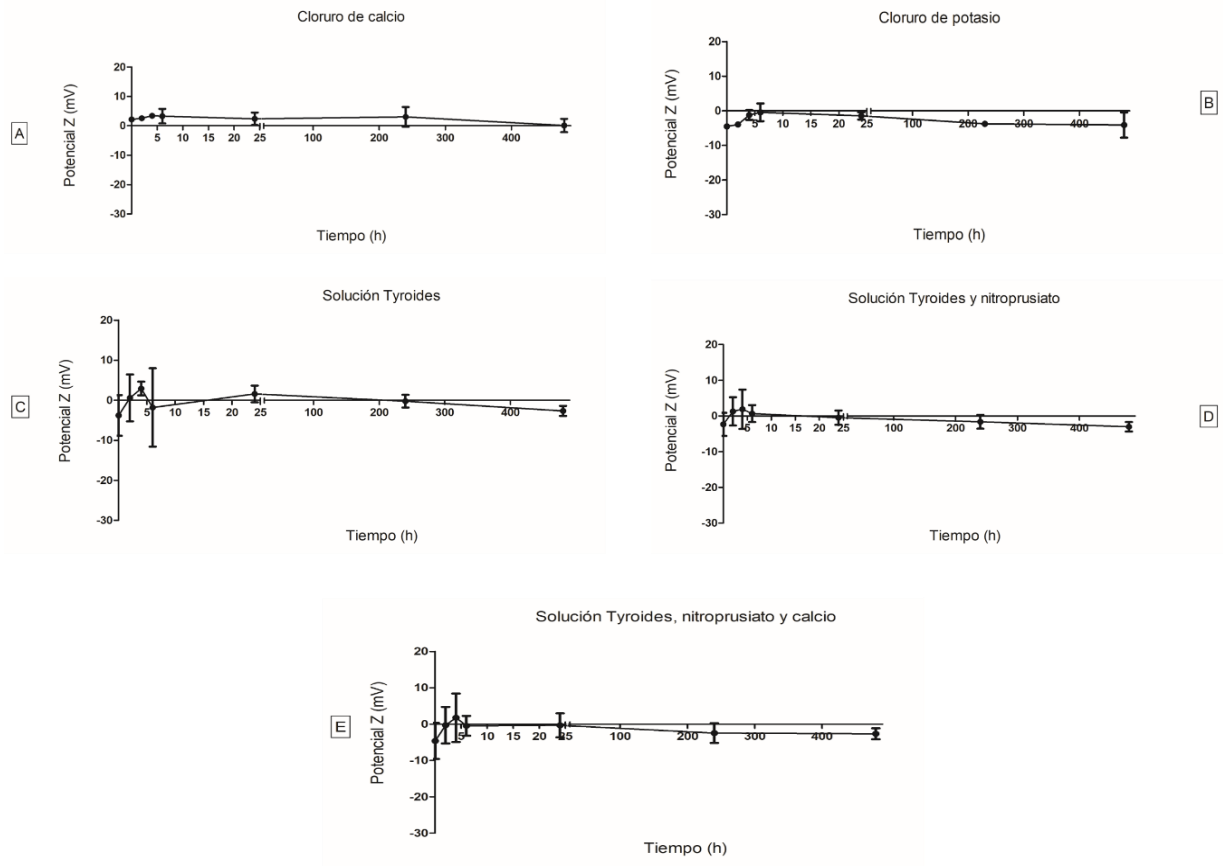

Figura 23. Graficas del Potencial Z de las partículas al estar expuestas a medios ricos en electrolitos. Las gráficas muestran que el potencial Z (mV) de las partículas es muy próximo o si no en el 0, lo que estaría indicando una alta tendencia a la aglomeración.

En el caso de las nanopartículas mantenidas en los medios simulados de los jugos gástricos e intestinales (Figura 24), se pudo observar en las muestras en los medios fase entérica (A), fase entérica final (B) y fase gástrica convencional (E), un incremento del diámetro hidrodinámico (d.nm) de casi el doble desde el tiempo cero (de 2 µm a 4 µm), el cual se mantuvo constante hasta los 20 días. Finalmente, en las demás muestras (C, D, F y G) el tamaño no se incrementó tan significativamente (≤ 2 µm), pudiendo concluir en este caso, que las nanopartículas fueron estables casi todos los 20 días. Es importante mencionar que en el caso de las nanopartículas en fase entérica final con brobióticos (D), el tamaño fue ≤1 µm después de 10 días y hasta el final del ensayo.

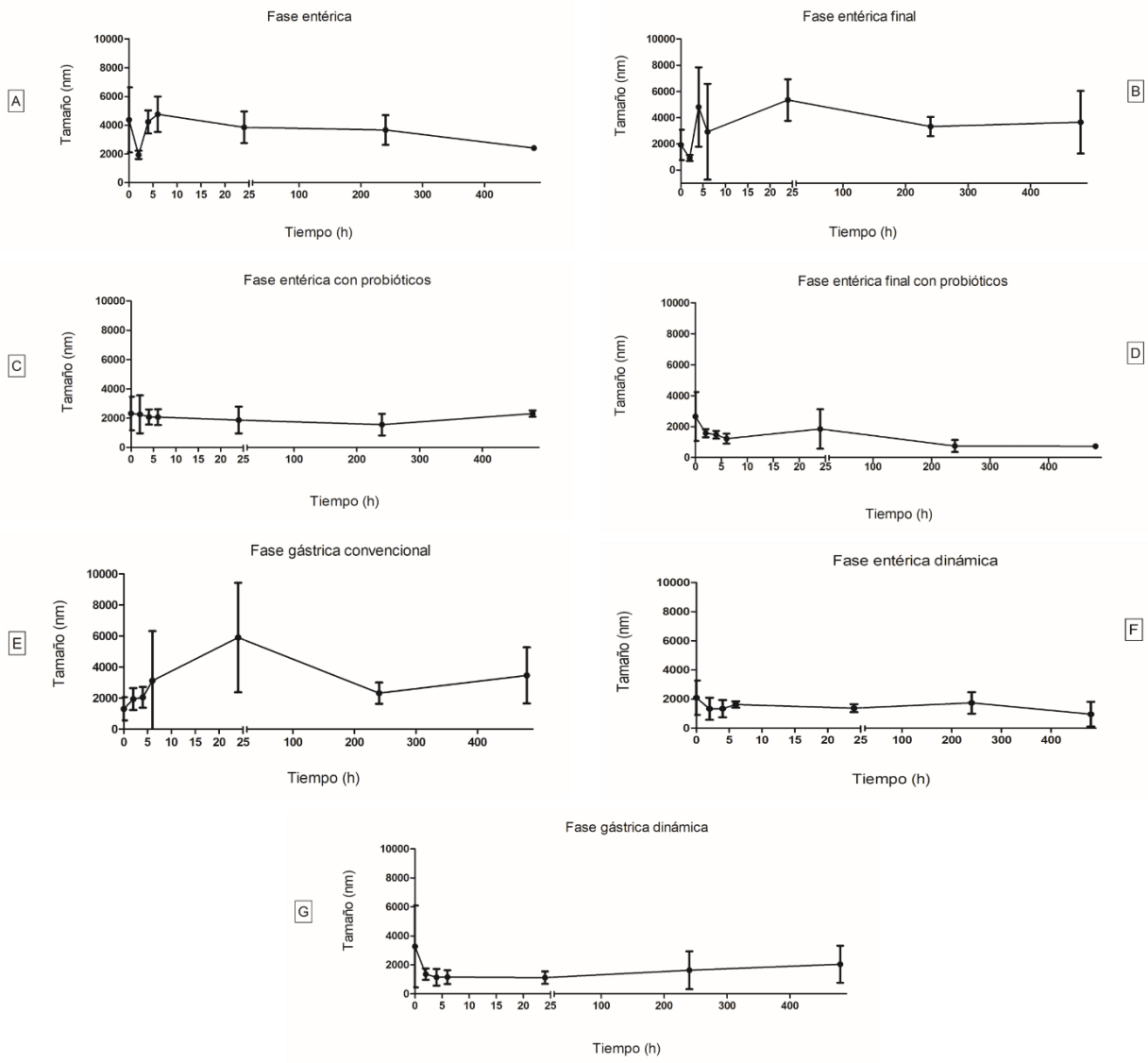

Figura 24. Graficas del diámetro hidrodinámico de la partícula al estar expuesta a medios ricos en materia orgánica. Las gráficas muestran el incremento de tamaño sufrido por las nanopartículas al estar expuesto a medios ricos en enzimas, fibras y microorganismos. Este incremento de tamaño se ve desde el tiempo 0 hasta el día 20, especialmente en las muestras fase entérica, fase entérica final y fase gástrica convencional. Sin embargo, en el resto de las muestras este incremento no es tan pronunciado.

En cuanto a los resultados del potencial Z de las muestras: fase entérica (A), fase entérica final (B), fase entérica con probióticos (C), fase entérica final con probióticos (D) y la fase gástrica convencional (E); mantuvieron un valor aproximado de -20 mV desde el tiempo 0 hasta los 20 días (Figura 25). Sin embargo, la muestra de fase entérica dinámica (F) tuvo un potencial Z aproximado de -15mV; mientras que la fase gástrica dinámica (G) mostro un potencial Z que al inicio del ensayo fue de -15mV pero que conforme paso el tiempo de incubación, este valor comenzó a disminuir acercándose al 0, manteniendo esa tendencia hasta el final del ensayo, lo que indicaría un proceso de aglomeración por parte de las nanopartículas, como se puede notar en la Figura 25.

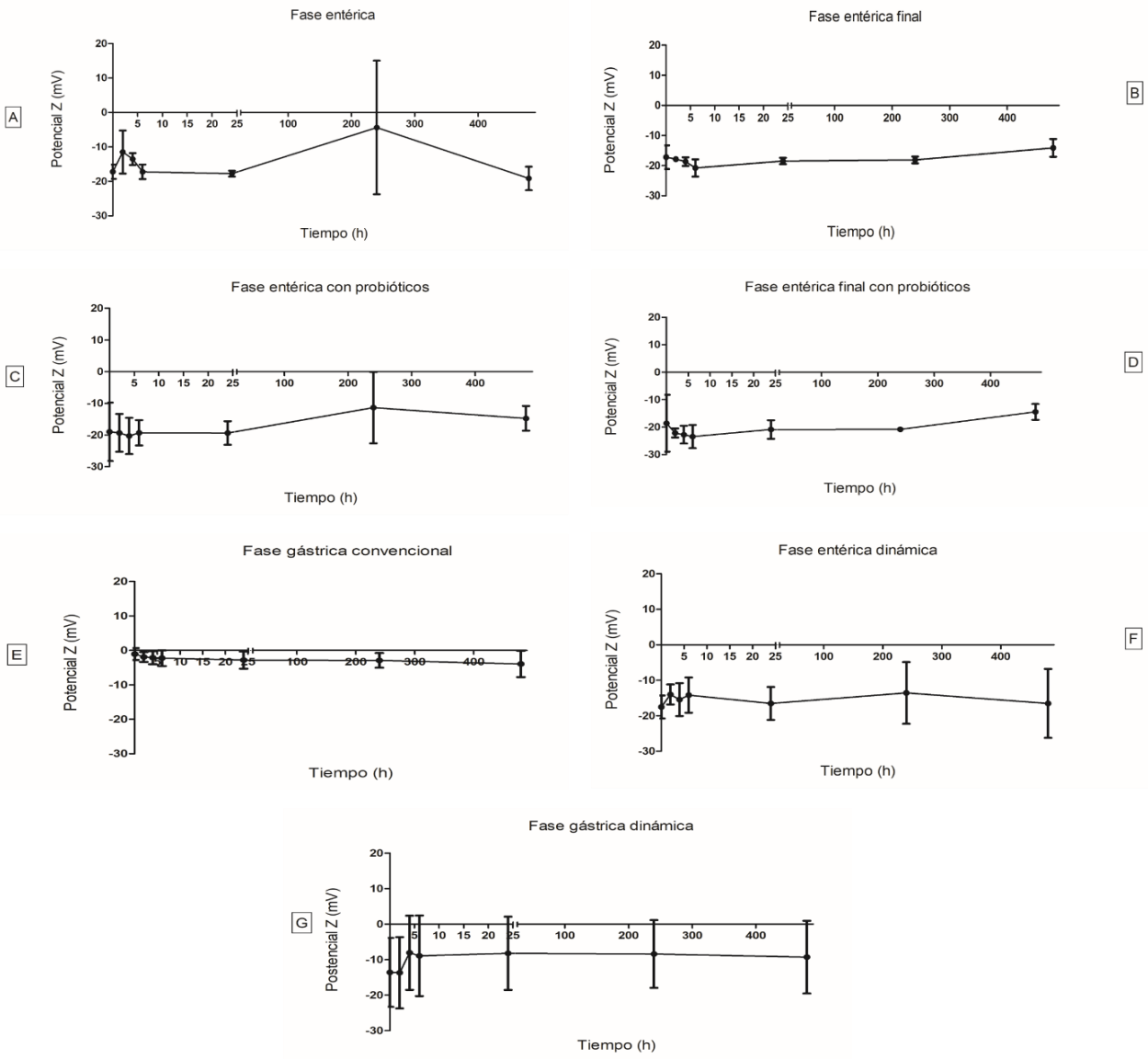

Figura 25. Graficas del Potencial Z de las partículas al estar expuestas a medios ricos en materia orgánica. Las gráficas muestran que los valores del potencial Z de todas, excepto fase entérica final, están alejadas del cero, lo cual nos podría indicar una baja tendencia a la aglomeración.

Capítulo 4. Discusión

A diferencia de los materiales en escala macrométrica, las micro y nanopartículas difieren de estos en sus propiedades fisicoquímicas, de las cuales podemos mencionar: aumentar su área superficial, cambio en sus propiedades mecánicas, incrementar su reactividad, entre otras. Sin saberlo podemos estar en contacto con muchos tipos de nanopartículas y son estas características las que pueden influenciar en la interacción de la partícula con el organismo. Por ejemplo, el PET se ha usado para resguardar la comida, para el transporte de agua, también se usa para el recubrimiento de prótesis contra el desgaste del pilón y el pie protésico (Castro, 2018), prótesis vascular (Uscategui et al., 2018), por mencionar algunos ejemplos. Sin embargo, el efecto que tienen las partículas de este mismo material, pero de tamaño micro y nano se desconocen aún.

En este trabajo de tesis, los resultados obtenidos muestran el efecto de las nanopartículas de PET sobre el tejido intestinal y cómo influyen en la tensión del tejido, lo que se puede traducir como efectos en el mecanismo contracción/relajación.

Par poder comprobar la viabilidad del segmento de tejido intestinal, una vez colocado en el sistema para medir la tensión, se le administró KCl, el cual tiene la función de contraer el tejido, ya que su mecanismo de acción es la de abrir los canales de calcio, permitiendo la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula del musculo liso. Posteriormente se procedió con la administración de las diferentes concentraciones de nanopartículas de PET en dos diferentes ensayos, bajas y altas concentraciones, lo cual nos permitió identificar varias cosas. La primera se observó en el caso de las concentraciones bajas, que se reflejó como el incremento máximo en los valores de tensión registrados hasta la administración de 10 µg/mL (Figuras 18 y 20), lo cual podría indicar que este es el límite de concentración máximo que tiene un efecto en la tensión del tejido intestinal en este ensayo ex vivo, ya que la siguiente administración (100 µg/mL), no mostro un mayor incremento en los valores de tensión y/o porcentaje de contracción. Esto se corrobora con los resultados observados en las concentraciones altas, ya que la administración de 250 µg/mL, mostro el mismo porcentaje de contracción (136 ± 39 %) del tejido que la concentración de 10 µg/mL (132 ± 22 %) como se observa en la tabla 3 y las figuras 20-C y 21-C.

El otro resultado destacable, está asociado a la respuesta del tejido al momento de la administración del nitroprusiato de sodio, ya que el efecto que poseen las nanopartículas de PET en incrementar la tensión de tejido intestinal parece también afectar la respuesta esperada de la administración del nitroprusiato de

sodio, ya que no hubo disminución significativa en los valores de tensión tanto para las concentraciones bajas, como para las concentraciones altas. La administración de dicho fármaco debería haber inducido una respuesta que se traduciría como una relajación del musculo, debido a que el nitroprusiato, actúa directamente sobre los canales de calcio actuando como donador de óxido nítrico (NO), cerrándolos e impidiendo la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula. Sin embargo, el tejido mantuvo prácticamente los mismos valores de tensión tanto en los ensayos con concentraciones bajas como altas.

De acuerdo con lo observado, es posible que exista una interacción por parte de la nanopartícula y los iones presentes en el medio como el Ca^{2+} y el K^{+}, indispensables en el proceso de contracción/relajación del musculo liso, interfiriendo con el equilibrio intra-extracelular, impidiendo el libre paso de iones ó reteniéndolos, lo que se podría observar como una contracción mantenida. Estos resultados nos podrían estar indicando que al interactuar el tejido con las nanopartículas plásticas se estén activando canales de calcio de más o está evitando que los canales se cierren, aun cuando se administra el fármaco encargado de cerrar los canales iónicos. También existe la posibilidad de estos eventos pasen al mismo tiempo. Eso explicaría por qué al momento de las administraciones de nanopartículas de PET, se aprecia un incremento en la tensión de los tejidos, pero no explicaría la falta de respuesta del tejido a la administración del nitroprusiato para que se lleve a cabo la relajación.

El proceso de relajación del nitroprusiato se debe a la acción que tiene como donador de óxido nítrico (NO), el cual tiene como función el bloquear los canales de calcio abiertos por el KCl. Sin embargo, en el tejido que estuvo en presencia con las nanopartículas de PET, podemos apreciar que no hubo un proceso de relajación significativo, lo cual nos llevó a realizar una segunda dosis de nitroprusiato, sin obtener un resultado comparable a lo observado en el tejido en presencia con las nanopartículas de TiO_2 (Figura 18), las cuales no parecen tener efectos en la respuesta de contracción/relajación del tejido intestinal.

En este caso, quizá debemos considerar las características fisicoquímicas tanto de la nanopartícula de PET como la molécula de NO (proveniente del nitroprusiato de sodio) ya que ambas son no polares, lo cual implica una alta afinidad entre ellas. Esto puede ser la respuesta, ya que ambas moléculas se encuentran en solución y puede haber nanopartículas suficientes para interactuar íntimamente con el NO limitando su disponibilidad en el medio, y por lo tanto impidiendo que llegue a su sitio de acción. Esta alta afinidad entre las nanopartículas y el nitroprusiato se puede ver explicar con los resultados de potencial zeta y diámetro hidrodinámico. En los valores obtenidos podemos ver que el potencial zeta de las muestras con nitroprusiato (solo y sus variantes), todos son cercanos al 0 mV (Figura 23), mientras que el diámetro

hidrodinámico fue 4 micrómetros (Figura 22), lo que se traduce como una alta afinidad entre la nanopartícula de PET y el NO en el medio, como lo muestra la Figura 27 situada en anexos.

Nuestros resultados muestran dos posibles mecanismos, uno asociado al efecto que puedan tener en los iones Ca^{2+} y K^{+} o en los canales que permiten su libre paso dentro y fuera de la célula. En la literatura ya se han reportado resultados al respecto, en el caso de los canales iónicos, Su et al. (2020) observaron que la exposición a microplásticos activaba los canales de calcio, sodio y potasio. Sus estudios los realizaron sobre dinoflagelados, sus resultados mostraron un incremento en genes que están relacionados con el transporte y la utilización de los iones, mencionando cambios en 13 genes. Aunque son organismos con un ciclo de vida mucho más corto, estos resultados podrían estar indicando que los microplásticos y nanoplásticos pueden estar influyendo en la respuesta de los canales iónicos de Ca^{2+}, Na^{+} y K^{+} y en nuestro caso, requeriríamos una mayor exposición de nuestras nanopartículas a los tejidos, especialmente en estudios in vivo, para que los cambios en la transcripción sean detectables.

Por otro lado, en lo relacionado a la afinidad del PET a los iones Ca^{2+} y K^{+}, Pekkaene et al. (2019) mencionan en su trabajo que es posible que el PET absorba más rápido el calcio y concluyen de acuerdo con sus observaciones que el PET lo dejé salir de la célula más lento.

En nuestro caso, los resultados obtenidos por DLS, nos han permitido analizar la interacción de las nanopartículas con los iones presentes del medio. En el caso de la solución Tyiroides (usado para mantener la homeostasis del tejido intestinal en los ensayos de contración/relajación) y la solución de KCl, es por medio de los resultados de potencial zeta y el diámetro hidrodinámico que podemos establecer ciertas afinidades y similitudes. Las muestras expuestas a un ambiente rico en iones como el cloruro de calcio, cloruro de potasio, y los medios de la solución Tyroides (con sus respectivas variantes), presentaron un incremento del doble del tamaño que poseía la partícula al inicio del experimento, el cual se mantuvo hasta los 20 días. Al analizar los resultados del potencial zeta de las respectivas muestras, se observó un potencial con una tendencia al cero, lo que significa que existe una alta afinidad entre ellos, lo que se traduce como una alta tendencia a la aglomeración de las nanopartículas y por lo tanto se encuentran menos dispersas.

Este tipo de fenómeno puede deberse en un principio a las características de las nanopartículas (carga superficial) y al tipo de ambiente en el que encuentren. Jia Li et al. (2018) mencionan que el tipo de interacción que existe entre materiales plásticos, los iones y los antibióticos, es debido principalmente a interacciones por puentes de hidrogeno, fuerzas Van der Waals y fuerzas electrostáticas. Sin embargo, en

un ambiente con una gran fuerza iónica se afectará la fuerza electrostática por las fuertes concentraciones de electrolitos (Na^+ y Ca^{2+}), ya que estos se atraen haciendo que las partículas se aglomeren (Figura 28, situada en anexos). De igual forma Dong et al. (2021) menciona que las partículas de PET sufrirán un proceso de aglomeración al estar en contacto con un medio rico en iones, lo cual estaría apoyando la teoría de Jia Li et al. (2018) y estaría fundamentando lo que se está observando en este trabajo.

Jia Li et al. (2018) menciona que, en el caso de la presencia de algún fármaco en el medio, los electrolitos competirán por los sitios de unión de la superficie de la partícula plásticas. Este fenómeno no es un evento aislado de las nanopartículas plásticas, ya que también se ha visto en nanopartículas metálicas.

Es importante mencionar que los tejidos expuestos a las nanopartículas de PET (tanto las altas como las bajas concentraciones), presentaban una rigidez mucho mayor a las expuestas a las mismas concentraciones de nanopartículas de TiO_2 y al tejido sin ningún tipo de estímulo; al momento de ser retirados de la cámara de ensayo.

Existe la posibilidad de que las nanopartículas de PET se encuentren recubriendo la superficie del tejido en su totalidad, absorban los componentes disueltos en el medio (incluidos los NO) e impidan que lleguen a su sitio de acción. Se sabe que el óxido nítrico, está presente en todos los tejidos y difunde de su origen (ya sea celular o como en nuestro caso proveniente de una fuente externa) hacia las células cercanas y puede cruzar las membranas celulares por sí solo, sin ayuda de ningún transportador. En la célula blanco se une a al grupo hemo de la guanilil ciclasa y activa la producción del Guanosín monofosfato cíclico (cGMP), estimulando la bomba de iones que expele Ca^{2+} desde el citosol (Lehninger, 2005).

En la literatura existen pocos estudios sobre tejidos intestinales y nanopartículas. Uno de estos reportes es el que se llevó a cabo con el organismo *C. elegans*, el cual estuvo expuesto durante dos días a diferentes partículas plásticas como las poliamidas, el polietileno, el polipropileno, el cloruro de polivinilo y el poliestireno, a diferentes concentraciones. Lei et al. (2018), observaron por microscopia de fluorescencia que las micropartículas no son letales o causan más daño por la dosis administrada, si no por el tamaño, ya que las micropartículas de una micra fueron más letales, causaron más daño en el intestino y provocaron una disminución de los niveles intestinales de calcio (Lei et al., 2018). Sin embargo, sus resultados no explican los mecanismos de regulación afectada, ni la interacción especifica de los microplásticos con el calcio. La interacción de las partículas con el ion calcio puede llevar como resultados un daño en la función del intestino, posiblemente los movimientos peristálticos se vean afectados, haciendo que el alimento no se mueva o se desplace a lo largo del tracto digestivo como se debe. Sin

embargo, debemos de mencionar que en este experimento el tejido estuvo directamente en contacto con una gran cantidad solo de nanopartículas, si lo extrapolamos a un intestino donde las nanopartículas estuvieran rodeadas de materia orgánica, el efecto observado experimentalmente quizá serían tan exacerbado.

Por otro lado, debemos considerar que los organismos en los cuales se han reportado los efectos de los nanoplásticos, difieren en longitud y fisiología del que pueden tener organismos de mayor tamaño, incluido el ser humano. Por lo tanto, los resultados acerca de la interacción de las nanopartículas y el medio que las rodea al momento de transitar por los diferentes segmentos del intestino, puede ayudar a predecir su interacción con las diferentes secciones del intestino.

Como ya se mencionó anteriormente, en el presente trabajo se utilizaron dos tipos de medios unos ricos en iones y los otros ricos en materia orgánica o materia orgánica natural (NOM, natural organic matter), como es referido en algunos textos como en Saavedra et al. (2019). Los datos obtenidos sobre el potencial zeta y el diámetro hidrodinámico, nos muestran la respuesta de las nanopartículas expuestas a los diferentes medios simulados tanto la versión convencional como la dinámica. Los resultados mostraron que el diámetro hidrodinámico de las partículas se encuentra en el rango de los micrómetros (Figura 24), ya que, en algunos casos como la fase entérica con probióticos, la fase entérica final con probióticos, la fase entérica dinámica y la fase gástrica dinámica; el diámetro de las nanopartículas se mantiene en 2 micrómetros mientras que en otros se incrementa al doble. En el caso de potencial Z en la mayoría de los casos se mantiene alejado del cero durante todo el ensayo (-20 mV en promedio), lo cual estaría indicando una menor tendencia a la aglomeración en el medio en el que se encuentran. Esto podría ser posible debido a la formación de una “corona” la cual les da una mayor estabilidad a las nanopartículas en los diferentes fluidos simulados debido a la materia orgánica (Figura 28 situada en anexos). En este punto, cabe destacar que la fase entérica final con probióticos, mostro una tendencia a disminuir el diámetro hidrodinámico, al final del ensayo, con valores cercanos a 1µm (Figura 24-F). Esto puede deberse a los metabolitos o subproductos producidos por los probioticos y que cambian la composición inicial del medio y como consecuencia existe una menor aglomeración de las nanopartículas. Sin embargo, son necesarios más ensayos con estos organismos para determinar el efecto que puedan ejercer el microbiota intestinal en los nanoplásticos.

Es de esperarse que la interacción con diferentes medios determine la tendencia a la monodispersión o la aglomeración de las nanopartículas de PET en función de la composición. Un ejemplo de esto es el reportado por V. Stock et al. (2020), ellos trabajaron con 5 diferentes tipos de micropartículas

(poliestireno, polietileno, polipropileno, tereftalato de poliestireno y cloruro de polivinilo} los cuales fueron expuesto a diferentes medios simulados. En sus observaciones notaron que estas nanopartículas se aglomeraban y lo asociaron a la formación de una corona por las proteínas que contienen los fluidos simulados propiciando un aumento de tamaño. Otro caso similar fue descrito por Saavedra et al. (2019), donde ellos utilizaron partículas de poliestireno de 200nm estabilizadas con carboxilo y amida para darles cargas; las cuales fueron expuestas a dos diferentes medios, uno que contenía sustancias húmicas y el otro polisacárido de alginato. Saavedra et al. (2019) concluyen que la aglomeración de las partículas se debe al efecto de absorción ya sea de un catión o de un ion presente en el medio de incubación. Esta conclusión refuerza los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo, donde en los medios ricos en iones, el incremento en el diámetro hidrodinámico fue evidente con dimensiones de hasta 4 µm y constante en el tiempo (Figura 22).

Por otro lado, aquellas nanopartículas que estuvieron en contacto con materia orgánica, tanto las del presente trabajo (tanto del modelo convencional como del modelo dinámico), como las de Saavedra y colaboradores; mostraron un potencial Z alejado del cero y en ambos casos la agregación se vio limitada, posiblemente debido a la corona de material orgánico que se formó alrededor de las partículas. Sin embargo, la muestra de fase entérica dinámica, aunque mostró un potencial Z cercano al cero, el tamaño de las nanopartículas fue de 2 µm en promedio a lo largo de todo el ensayo, este fue uno de los diámetros más pequeños obtenidos en los medios simulados. Esto pude deberse a la formación de una corona que rápidamente aísla a las nanopartículas en pequeños y muy definidos cúmulos, o posiblemente debido a la agregación de algún compuesto de la solución, similar a lo observado por Saavedra et al. (2019).

La formación de una corona alrededor de las partículas podría tener como resultado, que no solo sean estables, sino que podrían facilitar su absorción, incrementar la posibilidad de biodistribución y bioacumulación, causando daños a los tejidos afectados o posibles reacciones inmunológicas.

Capítulo 5. Conclusiones

5.1 Conclusiones.

Los resultados obtenidos mostraron que en el caso de las nanopartículas de PET las concentraciones de 10 µg/mL y 250 µg/mL en los ensayos de concentraciones bajas y altas respectivamente, presentan un efecto sobre la contracción muscular.

Las nanopartículas poseen una alta afinidad por los iones, en nuestro caso en particular con el ion Ca^{2+}, el cual interviene en la contracción y relajación muscular. De igual forma es posible que las nanopartículas estuvieran interactuando con el NO, proveniente del fármaco, provocando que su efecto se vea inhibido.

En medio o soluciones ricas en electrolitos, las nanopartículas sufrirán un proceso de aglomeración, incrementando su tamaño (diámetro hidrodinámico)

Las nanopartículas son más estables en medios ricos en materia orgánica posiblemente debido a la formación de una corona proteica, la que disminuye su aglomeración.

Los resultados obtenidos en esta tesis forman parte d ellos primeros estudios llevados a cabo para conocer los posibles efectos que pueden provocar los nanoplásticos en el tejido intestinal.

5.2 Perspectivas

Finalmente se puede resumir que fueron detectados algunos efectos por parte de las partículas sobre el tejido; sin embargo, es necesario el repetir estos experimentos e interacciones célula-nanomaterial para no solo cotejar, sino también para comprender mejor la interacción y los efectos del tejido con el material a corto, mediano y largo plazo. Ya que lo publicado al respecto no es suficiente para esclarecer y dar una buena información de los efectos por parte de estos micro y nanomateriales.

Es recomendable completar estos estudios con los cortes histológicos y microscopia electrónica de barrido (SEM) de los tejidos expuestos a las nanopartículas, para tener evidencia en que parte del intestino se quedan las nanopartículas y como es la interacción de estas con el tejido. También realizar estudios por

microscopia de fuerza atómica, para saber cómo se lleva a cabo la interacción a nivel celular con las nanopartículas. Otra estrategia sería la de realizar estudios, como espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) para averiguar con que grupos funcionales están interactuando las nanopartículas al estar en contacto con diferentes medios. Se podrían realizar ensayos electroforéticos para observar la composición de la corona de materia orgánica que se le forma a la nanopartícula al interactuar con los diferentes medios, para saber qué tipos de proteínas es la que la conforman. Finalmente es necesario el poder comparar estos experimentos, con partículas de mayor tamaño ($> 1\ \mu m$), con el fin de observar la diferencia entre micro y nanopartículas plásticas.

Literatura citada

Acecedo B. N. 2020. Efectos de los nanoplásticos en las células, tejidos y órganos del ser humano: Patrones de absorción intestinal y efectos a nivel celular. Grado en Nutrición Humana y Dietética. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

Anne M. Robertson, Paul N. Watton. 2013. Chapter 8. Mechanobiology of the arterial wall. Transport in Biological Media. Elsevier. pp. 275-347.

Argote, L.A. D y Sánchez, E. A. C.1990. Análisis tectónico del sistema transpresivo neogénico entre Macuspana, Tabasco, y Puerto Ángel, Oaxaca. Revista Mexicana de Ciencias Geológicas, 9(1), 21-32.

Beeva D. A, Borisov V.A, Mikitaev A.K, Ligidov M.Kh, Beev A.A and Barokova E.B. 2015.Controlling the barrier properties of polyethylene terephthalate. A review. International Polymer Science and Technology. 42(7).45-52.

Boticario C.B. y Angosto M.C. 2012. Digestión y metabolismo energético de los nutrientes. UNED. Centro de Plasencia. Cap 1. Pp 13-33.

Bouwmeester H., Hollmany, P.C., y Peters, R.J. 2015. Potential health impact of environmentally released micro and nanoplastics in the human food production chain experiences from nanotoxicology. Environmental science & technology. 49(15).8932-8947.

Carbery M, O´Connor W y Palanisami T. 2018. Trophic transfer of microplastic and mixed contaminants in the marine food web and implications for human health. Environment International. 115. 400-409.

Castro Junco J.O. 2018. Diseño de prótesis transfemoral. Tesis de Licenciatura. Fundación Universidad de América. Facultad de ingeniería Mecánica. Bogotá.

Castro N.P., Verbel J.O., y Padilla J.R. 2013. Nanotecnología aplicada a la medicina. Revista Científica Guillermo de Ockhman. 11.1. 125-133.

Cózar A., Echevarria F., González Gordillo J.I., Irigoien X., Ubeda B., Hernández León S., Palma Álvaro T., Navarro S., García de lomas J., Ruiz A., Fernández de Puelles M. L., and Duarte C.M. 2014. Plastic debris in the open ocean. Proceedings of the National Academy of Science (PNAS). 111.(28).10239-10244.

Chistoph R., Muñóz R. y Ventura A.H.J. 2105. Beneficios de los materiales plásticos. Publicación periódica de laboratorio de Nanotecnología. Instituto de Ciencias, tecnología e innovación.

Cristan Frias Arturo, Ize Irina, Gavilán Arturo. 2003. La situación de los envases de plásticos en México. Gaceta Ecológica. México.69.67-82.

Da Costa J.P., Santos P.S., Duarte A.C. y Rocha Santos T. 2016. (Nano)plastic in the environment-sources, fates and effects. Science of the total environment. 566-567. 15-26.

Da Cruz Moraes Jeremias. 2015. Nanotecnologia: O olhar do futuro. Universidad de Federal Do Pará. Campus Universitário do Tocantins /Cametá. Curso de Licenciatura em Ciéncias Naturais. Cametá-PA.

Delgado Fimia, O. 2019. Implicaciones de la exposición a microplásticos en salud humana. Universidad de Granada. Revisión Bibliográfica.

Deng Y., Zhang Y., Lemon B. & Ren. 2017. Tissue accumulation of microplastic in mice and biomarker responses suggest widespread health risk of exposure. Scientific reports. 7(1).1-10.

Dong S., Cai w., Xia j., Sheng L., Wnag W & Liu H.2021. Aggregation kinetics of fragmental PET nanoplastics in aqueous environment: Complex roles of electrolytes, pH and humic acid. Environmental pollution. 268.115828.Part B. 1-9.

Favela, J., Tentori M., Castro, L.A., González, V.M., Moran, E.B., Martínez-García, A.I. 2007. Activity recognition for context-aware hospital applications: issues and opportunities for the deployment of pervasive networks. Mobile Networks and Applications. 12(2-3),155-171.

Flores E.E. y Aranzábel M.D.U. 2002. Atlas de histología de vertebrados. UNAM. México. Cap. V. pp 71-91.

Gage, G.J., Kipke, D.R., & Shain.W. 2012. Whole animal perfusion fixation for rodents. JoVE (Journal of Visualized Experiments), (65), e3564.

García Sánchez M. 2017. Ingeniería básica de una planta de producción de Polietileno de tereftalato. Trabajo de fin de grado Ingeniería Química. Universidad de Sevilla. España.

Gigault J., Ter Halle A., Baudrimont M., Pascal P.Y, Gauffre F., Phi T.L y Reynaud S. 2018. Current opinion: What is a nanoplastic? Environmental pollution. 235.1030-1034.

Haffen B.B, Burns B. 2018. Physiology. Smooth Muscle. In: Statpearls. Treasured Island: Statpearls Publishing.

Hartmann N., Nolte T., Sarensen M., Jensen P., Baun A. 2015. Aquatic ecotoxicity testing of nanoplastics. In lessons learned from nanoecotoxicology. ASLO Aquatic Sciences Meeting, Granada.

Hermida Elida. 2011. Polímeros. Guía didáctica. Argentina. Encuentro. Educar. Cap. 9.pp. 2-70.

Higashida Hirose B. Y. 2005.Ciencias de la Salud. Mc Graw Hill, México. (5ª ed.). Cap. 12 pp 86-97 y Cap 16. 129-136.

Hirt, N., Body -Malapel, M. 2020. Inmunotoxicity and intestinal effects of nano-microplastics: a review of the literature. Particle and Fibre Toxicology. 17 (1).1-22.

Icaza-Chavez M.E. 2013. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. Revista de gastroenterología de Mexico.78(4):240-248.

Jaramillo E.B., Muñoz L. Ossa y Miguel P. 2014. Comportamiento mecánico del Polietileno Tereftalato (PET) y sus aplicaciones geotécnicas. Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia.70.207-219.

Jin Y., Lu L., Tu W., Luo T. y Fu Z. 2019. Impacts of polystyrene microplastic on the barrier, microbiota and metabolism of mice. Science of the total environment. 649. 308-317.

Juárez Roldan A.R. y Jiménez Munguía M.T. 2013. Condiciones gastrointestinales modelo utilizadas para evaluar probióticos encapsulados. Temas selectos de ingeniería de alimentos. 7(2):15-24.

Klaine S.J., Koelmans A.A. Horne N., Carley S., Handy R.D. Kapustka L.2012. Paradigms to assess the environmental impact of manufactured materials. Environmental Toxicology and Chemistry.31 (1).3-14.

Kik, k., Bukowska, D., & Sicinska, P.2020. Polystyrene nanoparticles: source, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms. Environmental Pollution, 262.114297.

Lei L, Wu S, Lu S, Liu M., Song Y, Fu Z, Shi H., Rayley S K M. He D. 2018. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish Danio rerio and nematode Caenorhanbditis elegns. Science of the total environment. 619-620. 1-8.

Lehner R., Weder C., Petri Fink A. and Rothen Rutishauser B. 2019. Emergence of nanoplastic in the environment and possible impact on human health. Environmental science & Technology, 53(4) 1748-1765.

Li J., Zhang K. & Zhang H. 2018. Absorption of antibiotics on microplastics. Environmental Pollution. 237.460-467.

López Carrasquero F. 2004. Fundamentos de polímeros. Escuela venezolana para la enseñanza de la Química. Universidad de los Andes. Venezuela. Facultad de Ciencias.

Molina Aroba C. 2018. Epitelio intestinal y alergias alimentarias. Tesis para obtener grado en Farmacia. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

Nelson, D.L., Cuchilio Foix, C.M., Lehninger, A.l., and Cox, M.M. 2006. Lehninger. Principios de Bioquímica (5ª ed.) Barcelona. Omega.

Paul M. B. Stock V., Cara-Carmona J., Lisicki E., Shopova S., Fressard V., Braeuning A., Sieg H. y Böhmert Li. 2020. Micro-and nanoplastics -current state of knowledge with the focus on oral uptake and toxicity. Nanoscale Advances. 2 (10), 4350-4367

Pekkanene Mattila M., Häkli M., Pölönene R. P., Mansikkala T., Junnila A., Talvitie E., Koivisto J. t., Kellomaki M and Aalto-Setälä K. 2019. Polyethylene Terephthalate Textiles Enhance the structural maturation of human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. Materiales, 12(11), 1805.

Pérez J.M.G. 2014. La edad de los polímeros un mundo de plásticos. Universidad de Burgos. Servicio de Publicaciones e imágenes institucionales. España.

Phuong N.N., Zalouk- Vergnoux A., Poirier L., Kamari A., Châtel A., Mounneyrac C. & Lagarde F. 2016. Is there any consistency between the microplastic found in the field and those used in laboratory experiments? Environmental Pollution. 211. 111-123.

PlasticsEurope 2016. Plastics-the Facts 2016. PlasticEurope Association of Plastics Manufacturers. https://www.plasticseurope.org/application/files/4315/1310/4805/plastic-the-fact-2016.pdf

Revel M., Chatel A. y Mouneryrac C. 2018. Micro(nano) plastics: A threat to human health? Current Opinion in Enviromental Science y Health. 1:17-23.

Rodríguez- Hernández, A.G., Muñoz-Tavares, J.A., Aguilar- Guzmán, C. & Vazquez-Duhalt, R. 2019. Novel and simple method for polyethylene terephthalate (PET) nanoparticles production. Environmental Science: Nano. 6(7).2031-2036.

Rojo Nieto E. y Montoto Martínez T.2017. Basuras marinas, plásticos y microplásticos: orígenes, impactos y consecuencias de una amenaza global. Ecologistas en Acción. Creative commons. España.

Ross Michael H y Wojciech Pawlina. 2009. Histología texto y atlas de color con biología celular y molecular. (5ta. ed). Buenos Aires. Panamericana.

Saavedra J., Stoll S., I. Slaveykova V.I. 2019. Influence of nanoplastic surface charge on eco-corona formation, aggregation and toxicity to freshwater zooplankton. Environmental pollution.252.715-722.

Salazar A. Blanca C. y Montoya C. Olga I. 2003. Importancia de los probióticos y prebióticos en la salud humana. Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 10.(2). 20-26.

Sastre R, De Aza S y San Román J 2004.Biomatriales. Ciencia y tecnología para el desarrollo. (CYTED). Italia.27-107.

Schirinzi G. F. Peréz Pomeda I., Snachis J.Rossini C., Farré M. y Barceló D. 2017. Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. Enviromental Resaearch. 159. 579-587.

Schwabl P., Köppel S., Königshofer P., Bucsics T., Trauner M., Reiberger T., Liebmann B. 2019. Detection of various microplastics in human stool: A prospective case series. Annals of internal medicine. 171(7). 453-457.

Serra J. 2016.Microbiota Intestinal. Atención primaria. 48 (6) :345-346.

Sosa Ana María. Junio 2002. Los plásticos: materiales a la medida. ¿Cómo ves? Revista de divulgación científica UNAM.43. pp. 22-25.

Stock V., Fahrenson C., Thuenemann A., Dönmez M.H., Voss L, Böhmer L., Braeuning A., Lampen A. & Sieg H. 2020. Impact of artificial digestion on the sizes and shape of microplastic particles. Food and Chemical Toxicology. 135. 111010.

Su Y, Zhang K., Zhou Z., Wang J., Yang X., Tang J., Li H., Lin S.2020. Microplastic exposure respresses the growth of endosymbiotic dinoflagellate Cladocopium goreaui in culture through affecting its apoptosis and metabolism. Chemosphere. 244. 125485.

Sun X., Chen B., Li Q., Lui N., Xia B., Zhu L. y Qu K. 2018. Toxicities of polystyrene nano and microplastic toward marine bacterium Halomonas alkaliphile. Science of the total environment. 642.1378-1385.

Thompson R.C., Olsen Y., Mitchell R.P, Davis A. Rowland, S.J., John A.W. & Russell A.E. 2004. Lost at sea: where is all the plastic? Science.304.5672.838.

Toussaint B., Raffael B., Angers-Loustau A., Gilliland D., Kestens V., Petrillo M., Rio-Echeverria Iria M. and Van den Eede G. 2019. Review of micro-and nanoplastic contamination in the food chain. Food Additives & contaminants: Part A. 36 (5). 639-673.

Uscateguí, Y.L., Diaz, L.E., & Valero, M.F.2018. Aplicaciones biomédicas de poliuretanos. Química Nova, 41(4). 434-445.

Wright S. L. and Kelly F. J. 2017. Plastic and human health: a micro issue? Environmental Science y technology. 51(12). 6634-6647.

Yang D., Shi H., Li, L., Li Ji, Jabeen K. y Kolandhassamy P. 2015. Microplastic Pollution in table salts from China. Environmental Science &Technology. 49(22).13622-13627.

Yong, C.Q.Y., Valiyaveetill, S. & Tang B.L. 2020. Toxicity of microplastics and nanoplastics in mammalian systems. International Journal of Environmental Research and public Health, 17(5), 1509.

Zhang N., Li Y.B., He H.R., Zhang J. F. y Ma G. S. 2021. You are what you eat: Microplastics in the feces of young men living in Beijing. Science of the total environment. 767. 144345.

Anexos

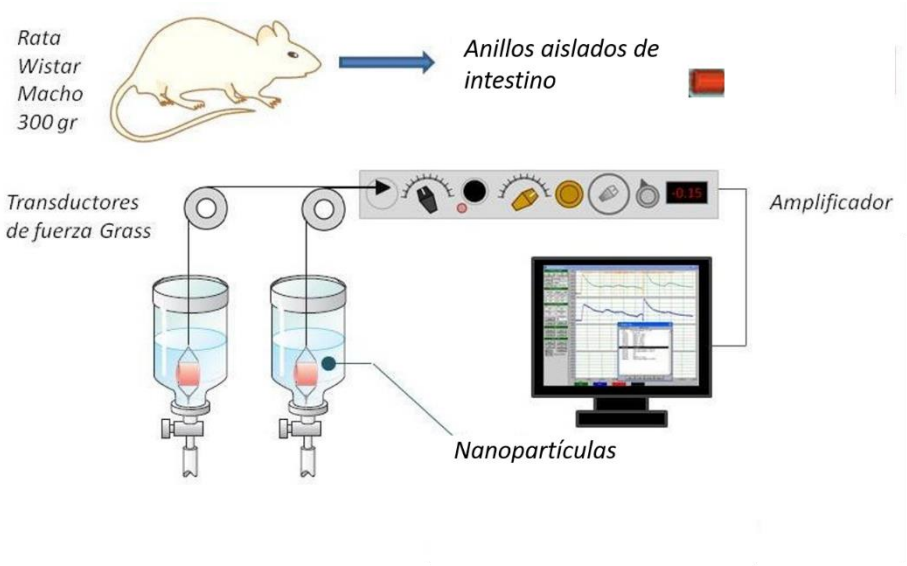

Figura 26. Representación esquemática del sistema usado para medir las variaciones del tono muscular del intestino de roedor.

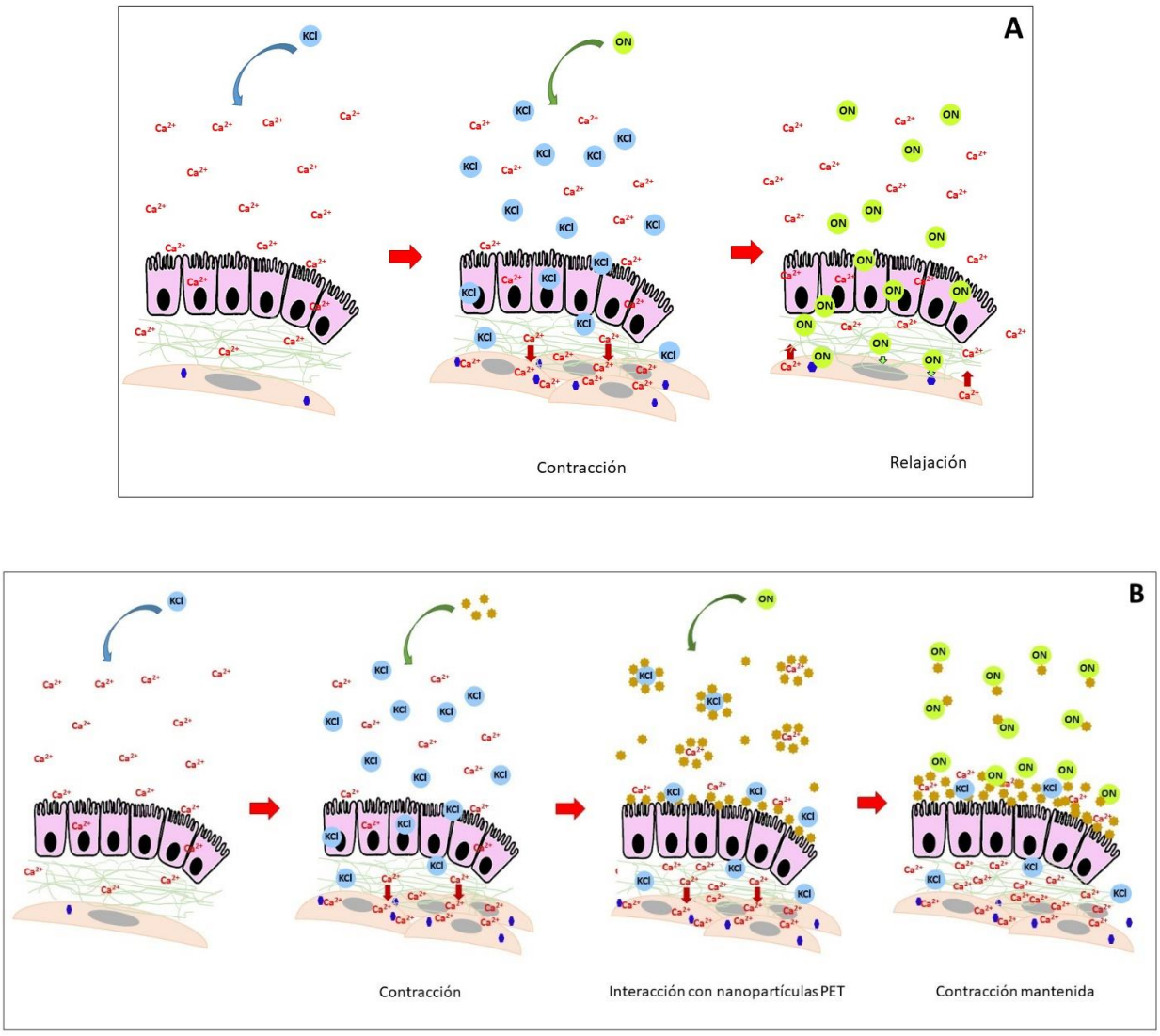

Figura 27. Representación esquemática del mecanismo de contracción/relajación asociada al estímulo del KCl y el nitroprusiato de sodio. (A) En condiciones normales, el KCl, abrirá los canales de Calcio, permitiendo el ingreso de Ca^{2+} al interior de la célula de musculo liso, llevando a cabo la contracción y la posterior administración del nitroprusiato de sodio, donará los ON necesarios para permitir la salida del Ca^{2+}. (B) En presencia de nanopartículas de PET, el efecto del nitroprusiato de sodio se ve inhibido. Esto puede deberse a la alta afinidad que tienen las nanopartículas de PET con el ON, ya que ambas moléculas son no polares.

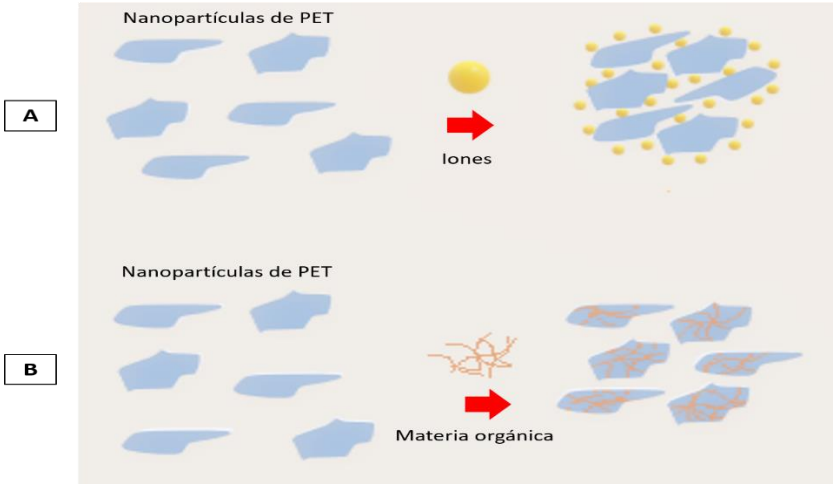

Figura 28. Representación esquemática del posible comportamiento de las nanopartículas de PET en diferentes medios. Imagen basada en Dong et al., 2021. (A) Nanopartículas de PET en un medio libre de iones se encontrarán en forma "libre", al momento de estar en contacto con un medio rico de iones las nanopartículas sufrirán un proceso de aglomeración. (B) Las nanopartículas libres al encontrarse con un medio rico en materia orgánica, pueden formar una corona de materia orgánica la cual les dará estabilidad y no sufrirán un proceso de aglomeración.