

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

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



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Evaluación toxicológica de las nanopartículas de policloruro de
vinilo (PVC) en pericitos vasculares del cerebro humano**

Tesis

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

Presenta:

Mary Paz Ramos Romero

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Mary Paz Ramos Romero

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández
Directora de tesis

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Dr. Andrés Zarate Romero

Dra. Nadia Lizeth Caram Salas



Dra. Catalina López Batista
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Mary Paz Ramos Romero** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Evaluación toxicológica de las partículas de policloruro de vinilo (PVC) en pericitos vasculares del cerebro humano.

Resumen aprobado por:

Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández
Directora de tesis

La contaminación generada por los desechos de plásticos representa un problema para el ambiente y la salud pública. El policloruro de vinilo (PVC) es uno de los principales desechos plásticos del sector industrial. El PVC es un polímero resistente que puede fragmentarse por factores bióticos y/o abióticos dando origen a lo que se conoce como microplásticos (MPLs) y nanoplásticos (NPLs). Se ha visto que los MPLs y NPLs pueden ser ingeridos por los organismos acuáticos y terrestres, y al ser absorbidos, pueden atravesar barreras biológicas como la hemato-placentaria e interactuar con diferentes órganos y tejidos. Sin embargo, existe poca información sobre la cantidad de partículas plásticas que ingresan en la barrera hematoencefálica. Es por ello, que esta investigación se enfocó en la obtención de las nanopartículas de PVC (NPs de PVC) mediante la técnica top-down y se determinó los posibles efectos toxicológicos utilizando como modelo de línea celular los pericitos vasculares del cerebro humano (HBVP-3D). Las propiedades fisicoquímicas de las NPs de PVC se analizaron por espectroscopía Ultravioleta-visible (UV-vis), Dispersión Dinámica de Luz (DLS), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Difracción de Rayos X (DRX) e Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR). Las NPs de PVC mostraron un pico de absorción característico en 206 nm, un diámetro hidrodinámico de 152 ± 4.2 d.nm y un potencial zeta de -25.0 ± 5.0 mV. Las NPs de PVC presentaron una distribución de tamaño entre 100 a 150 nm, morfología esferoide y tamaños heterogéneos. Además, el DRX y el FTIR mostraron fases cristalinas y amorfas del sulfato de calcio dihidratado y grupos funcionales característicos del PVC. En los ensayos *in vitro*, se demostró que los HBVP-3D al interactuar con las NPs de PVC en tiempos de 24, 48 y 72 horas a una concentración de 10 μ g se encontró alteraciones en la viabilidad, proliferación e internalización.

Palabras clave: Nanoplásticos, NPLs de PVC, nanotoxicidad, pericitos vasculares del cerebro humano

Abstract of the thesis presented by **Mary Paz Ramos Romero** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

Toxicological evaluation of polyvinyl chloride (PVC) particles in vascular pericytes of the human brain.

Abstract approved by:

PhD. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández
Thesis Director

The pollution originated by plastic waste represents a growing environmental and public health concern. One of the most common materials within plastic waste is Polyvinyl chloride (PVC) due to its importance in the industrial sector. Despite being relatively resistant compared to other plastic polymers, it tends to fragment into small particles such as microplastics (MPLs) and nanoplastics (NPLs) due to biotic and/or abiotic processes. Furthermore, the presence of these particulates inside of land and aquatic organisms has been previously reported. Once ingested, they can traverse through biological barriers such as the hematoplacental barrier and interact with different organs and tissue. Scarce information is available on the potential impact these particulates may have on the hematoencephalic barrier, and on the consequences that may have. Because of this, this work focused on the top-down synthesis of PVC nanoparticles (PVC-NPs) and the toxicological response of the cell line HBVP-3D (human brain vascular pericytes). The physicochemical properties of PVC-NPLs were analyzed by ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS), dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infra-red spectroscopy (FTIR). The PVC-NPs presented a characteristic absorption peak at 206 nm, a hydrodynamic diameter of 152 ± 4.2 nm and a zeta potential of -25.0 ± 5.0 mV. Their size distribution oscillates from 100 to 150 nm and have a spheroidal morphology. DRX and FTIR showed a combination of amorphous and crystalline phases related to anhydride calcium sulfate and characteristic groups from PVC. HBVP-3D in vitro assays were analyzed at 24, 48 and 72 hrs with the same concentration of 10 μ g of PVC-NPLs. Results showed clear alterations in viability, proliferation and internalization.

Keywords: Nanoplastics, PVC NPs, nanotoxicology, human brain vascular pericytes

Dedicatoria

Dedico esta tesis a Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más.

A mi familia (mamá, papá y hermano), por ser los principales promotores de mis sueños, ellos me han brindado su apoyo incondicional en momentos de alegría y tristeza.

A los actuales y futuros científicos y científicas que se apasionan por realizar ciencia con amor y dedicación.

A Mary Paz pequeña, lo lograste recuerda que todos tus sueños se pueden volver realidad solo con dedicación y constancia.

Agradecimientos

Durante el camino hacia el cumplimiento de todo proyecto, nunca es seguro el éxito, muchas veces habrá problemas o inconvenientes. Por ello, pensar que simplemente todo estará bien no es seguro, ni probable. Lo que sí es muy probable es que, durante todo tu camino, encontrarás aspectos y situaciones que tal vez no conocías aún. Por ejemplo, procesos y actitudes ajenas que alguna vez pudiste haber llegado a sentir, pero tan normales como todo lo que sucede en tu cotidianidad.

El darte cuenta de que las cosas no eran tan fáciles como al inicio de tu proyecto, parecía desanimarte. Pero debes tener fe y esperanza, creer que siempre hay algo más; que, si realizas las cosas con excelencia, siempre tendrás una buena recompensa. Debes más que creer en ti misma; darte cuenta de que habrá momentos y situaciones en las que simplemente las cosas se saldrán de tus manos. Sin embargo, con la confianza puesta en Dios todo saldrá bien.

Gracias a Dios, porque siempre me permite sonreír ante todos mis logros que son resultado de su ayuda, sé que cuando me pone a prueba, aprendo de mis errores y puedo mejorar como ser humano; gracias a él por ser la base de mi vida, por cada día en el que me permitió despertar no solo con vida, sino que también, me permitió continuar con salud, fuerzas y empeño.

A mi familia (mamá, papá y hermano), por cada día confiar y creer en mí. A mi madre por acompañarme cada larga y agotadora noche de estudio, por estar en cada momento difícil de mi vida, y por sus consejos para que yo pudiera ser mejor persona. A mi padre por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida. A mi hermano por su apoyo para lograr nuestros objetivos y nuestras metas en la vida. Les agradezco por estar presentes cada día y por todos los momentos de felicidad.

A mi asesora la Dra. Ana por darme la oportunidad de crecer académicamente, y por enseñarme sobre los temas de los nanoplásticos y cultivo celular los cuales desconocía. Con ella pude aprender el uso de diferentes equipos de caracterización, la realización de ensayos de viabilidad y celular, los diversos métodos de análisis de los datos obtenidos, etc. Quiero agradecerle también por los consejos que me dio en el transcurso de estos años, los cuales me ayudaron para poder seguir adelante en el ámbito científico. Gracias por aceptarme en su grupo de trabajo y confiar en mí para la realización de este proyecto.

Al comité de tesis que se tomó el tiempo para revisar mi trabajo dándome sugerencias y comentarios: Dr. Rafael Vázquez, Dr. Andrés Zarate Romero y Dra. Nadia Lizeth Caram Salas.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y la comunidad Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN-UNAM), por haberme abierto las puertas y ser parte de su comunidad durante dos años. En especial me gustaría agradecer a la Dra. Rufina Hernández, la Lic. Citlali Romero Manzano, la M.C. Dolores Sarracino Ramírez, y la Lic. Laura Adriana Rosales Vásquez quienes nos ayudan y nos facilitan con los trámites que engloba todo lo relacionado con el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) y con las inscripciones. A mis profesores, gracias por transmitirme sus conocimientos y por contestar mis dudas.

Agradezco al Departamento de Bionanotecnología del CNyN, porque pude hacer uso del laboratorio. En especial, me gustaría agradecer a la M.C. Itandehui por su asistencia técnica y disposición en cuanto a materiales y equipos que se utilizaron en el desarrollo de este proyecto.

Gracias a la M.C. Eloísa, Dr. Hugo, Dr. Diego y Dra. Gaby por el apoyo para la caracterización y la explicación en los análisis de mis datos para el desarrollo de esta tesis.

Al team nanoplásticos: Sheila y Sashenka que siempre estuvieron dándome ánimos en cada momento. Gracias por sus correcciones y observaciones. Ellas se volvieron unas muy buenas amigas que siempre llevaré en mi corazón. También a Kevin y Alexandra, estudiantes de licenciatura de Nanotecnología, que me apoyaron en la realización de diversos experimentos. Gracias por su amistad y por siempre darme ánimos. A mi compañero de cultivo Luis y Collins que siempre estaba dándome ánimos para que pudiera culminar mis experimentos y la escritura de tesis.

También me gustaría agradecer a mi novio Fidel gracias por tanto amor que me tienes y por estar en cada momento de alegría y nostalgia. Gracias por ser luz en mi vida y por apoyar todas mis metas de superación personal y académica. A la pequeña Mirai, mi gatita hermosa que me dio mucha alegría y nunca me dejó pasar momentos de tristeza, eres un amor.

A Kendra, Claudia y Seleny que siempre estuvieron en cada momento de alegría y nostalgia, cada momento con ellas fue muy especial, las aprecio mucho. También me gustaría agradecer al Dr. Rubén y su familia (Nikte, Itzel y Tere) por todo su apoyo, consejos y por los buenos momentos que pasamos de alegría. Gracias por motivarme en seguir en el área de las ciencias.

Al Doctor Jonás, gracias por sus buenos consejos y siempre darme palabras de motivación para poder culminar esta tesis.

A la familia de mi novio en especial a su mamá María Helena y su hermano Luis Román, muchas gracias por todo su apoyo y motivación son unas bellas personas que aprecio mucho.

A la psicóloga Yahaira, por todo su apoyo en cada momento, por sus consejos y apoyo emocional que me estuvo dando en los momentos más difíciles de mi vida.

A las encargadas de la revisión de tesis en biblioteca Nadua Dajlala y Elizabeth Avilés, por su apoyo para hacer el trámite de revisión lo más agradable posible y por el tiempo que estuvieron invirtiendo en las capacitaciones para las revisiones de tesis.

A mis compañeros(as) del departamento de Bionanotecnología y del posgrado de Nanociencias: Anaid, Andrea, Jusseth, Gloria, Mitzi, Astrid, Stefi, Juanpi, Carlos, Mariana, Anaid, Eli, Fernanda, Raúl y Morrison por su apoyo y asesoramiento.

A mis amigos(as) Selene, Karol, Isamara, Gaby y Jovany que siempre estuvieron dándome ánimos y acompañándome en este proceso. Además de ayudarme cuando se me presentaban problemas, sin duda fueron un gran apoyo. Mis verdaderos amigos(as) son considerados como hermanos para mi vida, tenerlos es una bendición que no tiene palabras que la describan. El poder contar y disfrutar con una persona en mi vida que me apoya y ayuda desinteresadamente, eso es un verdadero tesoro.

A mis amistades de Fe en Acción de Ensenada Baja California (Carmen, Claudia, David, Paty, Alejandra, Eloísa, Alicia, Sofí, Joaquín). Gracias por estar siempre al pendiente de mí y estar orando cada día que estuve en mi estadía; todos los mensajes y sus devocionales fueron una bendición en mi vida ya que me reconfortaban para seguir con mi vida.

A la familia Güitrón, gracias por todo su apoyo en especial al pastor Claudio y su esposa Maura. Quiero agradecerles por todas sus oraciones, sus consejos, y su apoyo para seguir en el camino de Dios. Le agradezco a Dios que los pude haber conocido. Gracias por adoptarme como su hija y siempre estar dándome consejos en los momentos de felicidad y de tristeza; los aprecio mucho.

También me gustaría agradecer a la Dra. Delia que siempre estuvo al pendiente de mí. Gracias por sus oraciones y por motivarme a seguir preparándome día con día en el área de las ciencias. A mi amiga Susana y Dulce unas personas muy especiales que estuvieron apoyándome y enseñándome a utilizar diferentes programas para el análisis de datos bioestadísticos. En especial quiero agradecer a mi amiga Susana, gracias por escucharme y motivarme a seguir adelante, te quiero mucho. Al Doctor Jonathan por su apoyo y asesoramiento con el programa X`Pert High Score Plus.

A la Lic. Laura Osuna, una bella persona que me apoyo en cada momento, gracias por todos los ánimos y por adoptarme como su hija. A mi tía Aurora y la familia Rosales quiero agradecer sus consejos, apoyo incondicional y sus oraciones. A mi tía Carmen, que ya se encuentra en el cielo gracias por todo tu apoyo y tus buenos consejos siempre te recordaré y a su esposo mi tío Toño que siempre está dándome muy buenos consejos desde que era pequeña hasta ahora.

A mis vecinos(as) Iris y Dani gracias por los buenos momentos que vivimos juntos. En especial Suhei, mi roomie que teníamos excelentes noches de estudios, gracias por tu amistad.

A mis alumnos(as) de la preparatoria ITECI por motivarme y darme su confianza para poder compartirles mis conocimientos. A Marta Elena por su apoyo en el proceso de la contratación como ayudante de la UNAM. Al Doctor Francisco y Doctor Oscar por brindarme la confianza para ser su ayudante en la materia de probabilidad y estadística y temas selectos de ingeniería en nanotecnología.

A mis compañeros de trabajo de la universidad Xochicalco, la Dra. Barbara, la Dra. Dania, la L.N Itzel, Dra. Blanca, Dr. Cossio, Gerardo y el Dr. Alvarado gracias a ellas tengo muy bellos momentos de alegría, les quiero agradecer por sus buenos consejos, porque cuando tenía días muy caóticos ellas eran mi dosis de a felicidad.

A mis alumnos(as) de la universidad Xochicalco de la carrera de Bioingeniería, gracias por ser esa dosis de alegría y por motivarme y darme su confianza para poder compartirles mis conocimientos.

A la señora de los tamales y su hija gracias por estar al pendiente de mí y siempre llevarme en sus oraciones en cada momento.

Al grupo de divulgación Nextia Lab (Alan, Vero, Sandino, Dulce) y Mujeres Líderes en Stem-Ciudad Victoria (Bella) por su apoyo y confianza para poder realizar eventos de divulgación como talleres y

eventos científicos. De ellos he aprendido mucho y son unas excelentes personas a las que admiro por todo lo que han realizado para que nuestras futuras generaciones conozcan de la ciencia.

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

Gracias a la vida por este nuevo triunfo, gracias a todas las personas que me apoyaron y creyeron en la realización de esta tesis.

Gracias a las personas que tienen la oportunidad de leer esta tesis que fue realizada con dedicación y con mucho apoyo de mi asesora.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	xiii
Lista de tablas	xvii
Lista de abreviaturas.....	xviii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Plástico	1
1.2 Panorama general de la contaminación ocasionada por plásticos.....	5
1.3 Policloruro de vinilo (PVC).....	6
1.4 Micro y nanoplásticos	7
1.4.1 Origen de los microplásticos y nanoplásticos	8
1.4.2 Acumulación de micro y nanoplásticos en el medio ambiente	9
1.4.3 Introducción de los micro y nanoplásticos en la cadena trófica.....	10
1.4.4 Vías de exposición de los micro y nanoplásticos en el ser humano	10
1.4.5 Interacción de los micro y nanoplásticos en el cerebro.....	12
1.5 Barrera hematoencefálica.....	14
1.6 Pericitos vasculares del cerebro humano	15
1.7 Antecedentes	16
1.8 Justificación	20
1.9 Hipótesis.....	20
1.10 Objetivos	20

1.10.1	Objetivo general.....	20
1.10.2	Objetivos específicos.....	21
Capítulo 2.	Metodología.....	22
2.1	Preparación de las NPs de PVC.....	22
2.2	Caracterización de las NPs de PVC	23
2.2.1	Microscopía Electrónica de Transmisión	23
2.2.2	Espectroscopía de difracción de rayos X (DRX).....	24
2.2.3	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	26
2.2.4	Espectroscopía de Ultravioleta-Visible	27
2.2.5	Dispersión dinámica de luz (DLS)	28
2.3	Mantenimiento de la línea celular	30
2.3.1	Conteo celular	30
2.3.3	Viabilidad y proliferación en presencia de las NPs de PVC	31
2.3.3.1	Ensayos de viabilidad y proliferación celular con MTT	31
2.3.3.2	Ensayos de viabilidad y proliferación celular con Alamar Blue	33
2.3.3.3	Análisis estadístico	35
2.4	Ensayo de internalización en presencia de las NPs de PVC	35
2.4.1.1	Ensayo mediante microscopía de fluorescencia	35
2.4.1.2	Marcaje de las NPs de PVC.....	36
2.4.1.3	Microscopía confocal	37
2.4.1.4	Mito-ID Red	39
Capítulo 3.	Resultados	41
3.1	Caracterización de las NPs de PVC	41
3.1.1.	Análisis de las NPs de PVC mediante TEM	41
3.1.2	Análisis de NPs de PVC mediante DRX.....	41

3.3.3	Análisis de NPs de PVC mediante FTIR.....	43
3.3.5	Análisis de NPs de PVC mediante DLS.....	45
3.3.5.1	Distribución de tamaños y potencial zeta.....	45
3.3.5.2	Punto isoeléctrico de las NPs de PVC.....	46
3.3.6	Evaluación de la toxicidad de las NPs de PVC.....	48
3.3.6.1	Viabilidad y proliferación celular de los HBPV-3D con las NPs de PVC.....	48
3.3.6.1.1	Ensayo MTT.....	48
3.3.6.1.2	Ensayo Alamar Blue.....	50
3.3.7	Ensayos de internalización de las NPs de PVC en los HBPV-3D.....	53
3.3.7.1	Microscopía de fluorescencia.....	53
3.3.8	Microscopía confocal.....	56
3.3.8.1	Internalización de las NPs de PVC en los HBPV-3D.....	56
3.3.8.2	MITO-ID.....	59
Capítulo 4.	Discusión.....	62
Capítulo 5.	Conclusiones.....	68
5.1	Conclusiones.....	68
5.2	Perspectivas.....	68
Literatura citada.....		69
Anexos.....		85

Lista de figuras

Figura 1. Producción anual y global del plástico en millones de toneladas.....	1
Figura 2. Principales países productores de plásticos a nivel mundial en el 2021.	5
Figura 3. Datos extrapolados del porcentaje de plástico desechado, incinerado y reciclado en el 2023.	6
Figura 4. Fórmula química y proceso de polimerización del PVC.	6
Figura 5. Proceso del origen de los micro y nanoplásticos.	9
Figura 6. Ilustración esquemática que muestra las vías de exposición humana de los MPLs y NPLs, a través del (A) aire (el pulmón), (B) vía oral (tracto gastrointestinal) y (C) la vía cutánea (piel)... .	11
Figura 7. Esquema que ilustra el impacto de la exposición a nanoplásticos en el eje intestino-cerebro.	13
Figura 8. Esquema de la barrera hematoencefálica. Elaboración propia en BioRender, 2023.	15
Figura 9. Esquema del sistema vascular cerebral, que ilustra en donde se encuentran los pericitos vasculares del cerebro humano.	16
Figura 10. Proceso para la obtención de las NPs de PVC.	23
Figura 11. Señales que genera el haz de electrones de alta energía al interactuar con una muestra.	24
Figura 12. Principio de Difracción de Rayos X. Editado de Abhilash et al., 2016.	25
Figura 13. Esquema del funcionamiento de un espectrofotómetro de FTIR.	26
Figura 14. A) Representación del diámetro hidrodinámico de una partícula en suspensión. B) Ilustración de la intensidad de la luz dependiente del tiempo dispersada por partículas, que fluctúan mediante el movimiento browniano.	29
Figura 15. Esquema de la cámara de Neubauer.	31
Figura 16. Principio del ensayo de viabilidad celular MTT.	32
Figura 17. Esquema de la metodología del ensayo de viabilidad y proliferación	33
Figura 18. Principio del ensayo de viabilidad celular Alamar Blue.....	34
Figura 19. Esquema de la metodología del ensayo de viabilidad y proliferación MTT.....	34
Figura 20. Esquema de la metodología del ensayo de microscopía de fluorescencia. Elaboración propia en BioRender, 2023.	37
Figura 21. Diagrama esquemático de la estructura un microscopio confocal.	38

Figura 22. Espectro de excitación y emisión de los fluoróforos utilizados para diferenciar la actina (verde), el núcleo (azul) y las NPs de PVC (naranja).....	39
Figura 23. Espectro de excitación y emisión de los fluoróforos utilizados para diferenciar el núcleo (azul), el MITO-ID (amarillo) y las NPs de PVC (naranja).....	40
Figura 24. A) Micrografía de las NPs de PVC obtenidas mediante TEM y B) Distribución de los tamaños de las NPs de PVC.....	41
Figura 25. Patrón de difracción del tubo de PVC, PVC envejecido y NPs de PVC.	42
Figura 26. Espectro de transmitancia del FTIR para las muestras del tubo de PVC, PVC envejecido y NPs de PVC.	44
Figura 27. Espectro de UV-Vis de las NPs de PVC.	45
Figura 28 . Punto isoeléctrico de las nanopartículas de PVC resuspendidas en diferentes soluciones de pH.	47
Figura 29. Viabilidad celular de las HBPV-3D en presencia de diferentes concentraciones de las NPs de PVC para el ensayo de MTT.....	49
Figura 30. Viabilidad celular de las HBPV-3D en presencia de diferentes concentraciones de las NPs de PVC para el ensayo de Alamar Blue.	52
Figura 31-1. Micrografías obtenidas mediante microscopía de fluorescencia a 10x. Se muestran los cambios que experimentan los HBPV-3D durante las 0 y 24 h, con NPs de PVC a una concentración de 10 µg/mL.	54
Figura 32. Imágenes del control positivo de los HBPV-3D obtenidas por microscopía confocal. El núcleo fue teñido con DAPI (colorante azul) y el citoesqueleto correspondiente a la actina conjugada con el colorante fluorescente (verde).....	57
Figura 33. Imágenes de los HBPV-3D con 10 µg de NPs de PVC obtenidas por microscopía confocal. El núcleo fue teñido con DAPI (colorante azul), el citoesqueleto con FITC correspondiente a la actina conjugada con el colorante fluorescente (verde) y las NPs de PVC (rojo de Nilo).....	58
Figura 34. Imágenes del control positivo de los HBPV-3D obtenidas por microscopía confocal. El núcleo fue teñido con Hoechst (colorante azul) y las mitocondrias con Mito-ID (colorante rojo).	60
Figura 35. Imágenes de las HBPV-3D con 10 µg de NPs de PVC obtenidas por microscopía confocal. El núcleo fue teñido con Hoechst (colorante azul), las mitocondrias con Mito-ID (colorante rojo) y las NPs de PVC (con rojo de Nilo).....	61
Figura 36. Distribuciones de tamaños y potenciales zetas en H ₂ O desionizada obtenidos mediante DLS. A.1 Concentración 10 ng, A.2 Concentración 100ng, A.3 Concentración 100 µg, A.4 Concentración 10 µg, A.5 Concentración 1 µg, A.6 y Concentración 1 mg.	88
Figura 37. Distribuciones de tamaños de las NPs de PVC de sus respectivas concentraciones mediante DLS. A) Se representa la distribución de los tamaños en DMEM y B) DMEM suplementado. Es importante mencionar que las concentraciones corresponden A.1) 10 ng, A.2) 100ng y A.3) 100 µg.....	89

Figura 38. Distribuciones de tamaños de las NPs de PVC de sus respectivas concentraciones mediante DLS. A) Se representa la distribución de los tamaños en DMEM y B) DMEM suplementado. Es importante mencionar que las concentraciones corresponden A.4) 10 μg , A.5) 1 μg y A.6) 1 mg.
..... 90

Lista de tablas

Tabla 1. Tipos de termoplásticos más comunes y sus aplicaciones	3
Tabla 2. Propiedades que definen a los nanoplásticos	8
Tabla 3. Resumen de las investigaciones relacionadas con la toxicidad de MPLs y NPLs en ensayos <i>in vitro</i> , en diferentes líneas celulares y con diferentes tipos de plásticos	19
Tabla 4. Resultados de las mediciones del equipo DLS, se muestra el promedio del tamaño (diámetro hidrodinámico) y potencial zeta de los medios empleados como el agua, el DMEM y DMEM suplementado (10% SFB, 1% antibiótico-antimicótico y 1% del suplemento de los factores de crecimiento endotelial y de pericitos).....	46
Tabla 5. Resultados de las mediciones del equipo DLS, se muestra el promedio del tamaño (diámetro hidrodinámico) y potencial zeta de las disoluciones amortiguadoras a diferentes pH	47
Tabla 6. Resultados de las mediciones del ensayo MTT, se muestra el promedio del porcentaje de viabilidad celular para cada una de las concentraciones de las NPs de PVC.	48
Tabla 7. Resultados de las mediciones del ensayo Alamar Blue, se muestra el promedio del porcentaje de viabilidad celular para cada una de las concentraciones de las NPs de PVC	50
Tabla 8 . Parámetros cristalográficos del carbonato de calcio.....	85
Tabla 9 . Parámetros cristalográficos del sulfato de calcio hidratado	86

Lista de abreviaturas

ABS	Acrilonitrilo Butadieno Estireno
H ₂ O	Agua
ANIPAC	Asociación Nacional de Industrias del Plástico
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
BHE	Barrera hematoencefálica
T98G	Línea celular de cerebro humano
HeLa	Línea celular de epitelio del ser humano
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Cloruro de calcio dihidratado
EC ₅₀	Concentración efectiva máxima
DRX	Difracción de Rayos-X
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
SDS	Dodecilsulfato de sodio
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
SAN	Estireno y acrilonitrilo
MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón
LUHMES	Mesencéfalo humano de Lund
MPLs	Microplásticos
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
Mt	Millones de toneladas
NPs	Nanopartículas
NPs de PVC	Nanopartículas de policloruro de vinilo
NPLs	Nanoplásticos
HBVP	Pericitos vasculares del cerebro humano
PE	Polietileno
HDPE	Polietileno de alta densidad
LDPE	Polietileno de baja densidad
PC	Policarbonato
PS	Poliestireno
PS-E	Poliestireno expandido
PP	Polipropileno
PVC	Policloruro de vinilo
PMMA	Polimetilmetacrilato
SNC	Sistema Nervioso Central
SPI	Sociedad de la Industria de Plásticos
PTE	Tetraéster de perileno
THF	Tetrahidruforano
UV-Vis	Ultravioleta Visible
UIQPA	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
PET	Tereftalato de polietileno

Capítulo 1. Introducción

1.1 Plástico

Los plásticos son polímeros orgánicos que pueden ser sintéticos o semisintéticos. Su composición se caracteriza por poseer cadenas de átomos que contienen carbono, oxígeno, nitrógeno, hidrógeno, azufre o cloro (Thompson et al., 2009). La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (UIQPA) define a los plásticos como polímeros orgánicos de alto peso molecular que provienen de los procesos petroquímicos (da Costa et al., 2016; Vert, 2012).

Es importante mencionar que en el año de 1907 fue producido el primer plástico sintético, denominado baquelita (C_6H_5OH) (da Costa et al., 2016). A partir de su creación se generó un gran interés por este tipo de materiales, y a partir del año de 1950 se desarrollaron de manera exponencial una gran cantidad de plásticos (da Costa et al., 2016; Geyer et al., 2017). Para el año 2015, la producción del plástico a nivel mundial fue de 381 millones de toneladas (Mt) (Geyer et al., 2017) y se espera que la tendencia siga en aumento con respecto al transcurso de los años, como se muestra en la figura 1.

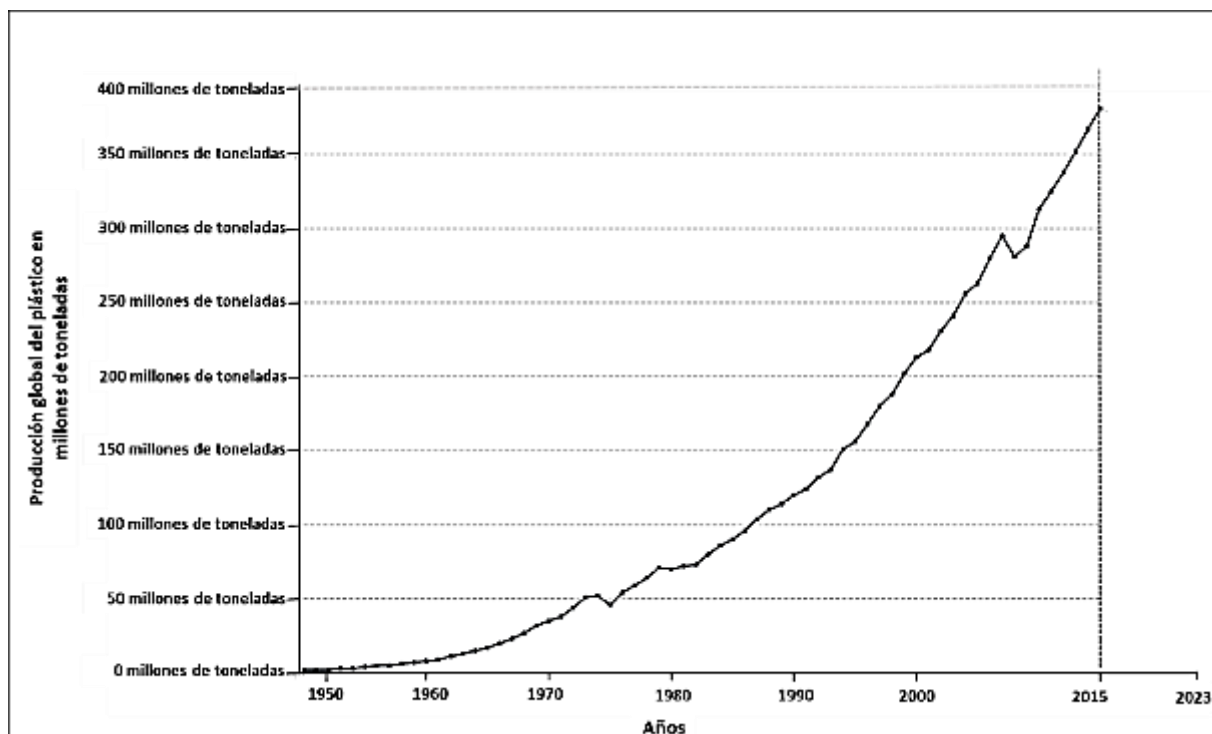


Figura 1. Producción anual y global del plástico en millones de toneladas. Editado de Geyer et al., 2017.

Las propiedades de los plásticos dependen del arreglo atómico, la composición química y del método de procesamiento industrial (Thompson et al., 2009). Algunas de las propiedades que presentan los plásticos son: Baja densidad, suelen ser impermeables, son aislantes eléctricos, conductores térmicos, maleables y son resistentes a la corrosión (Vert, 2012; Thompson et al., 2009). Además, a estos materiales se les pueden adicionar estabilizadores térmicos y aditivos (inorgánicos, orgánicos, minerales, naturales y sintéticos) para mejorar su rendimiento o reducir sus costos de producción (Pérez, 2014; Vert, 2012; Hermida, 2011; Ureta, 1989).




Los plásticos se pueden clasificar respecto a la composición de su estructura molecular, en donde se encuentran los plásticos amorfos, cristalizables y semicristalizables (Álvarez, 2021; Helmetine, 2020). A partir de las diversas clasificaciones, se determina que los tipos de plásticos que existen son: Los elastómeros, termoestables y termoplásticos (Álvarez, 2021).





Se conocen como elastómeros a los polímeros con elevada elasticidad y alto grado de resistencia a la deformación (Meseguer–Valdenebro et al., 2020). Los plásticos termoestables, son los polímeros que al solidificarse mantienen una forma estable, cuentan con una estructura tridimensional amorfa, poseen fuerzas intermoleculares bajas y resistencia a la deformación (Helmetine, 2020; Castillo-Rodríguez, 2012).

Un termoplástico es aquel que a temperaturas elevadas se puede deformar o moldear. Este material se endurece en un estado de transición vítrea (Álvarez, 2021), además, son polímeros de alto peso molecular que suelen ser amorfos y algunos pueden presentar cristalinidad (Helmetine, 2020). De acuerdo con la Sociedad de la Industria de Plásticos (SPI), los termoplásticos más comunes, se clasifican por sus propiedades, usos comunes y códigos de identificación (Geyer et al., 2017; American Chemistry Council, 2017), como se observa en la tabla 1.

Además, se ha visto que los termoplásticos como el Policloruro de vinilo (PVC), Tereftalato de polietileno (PET), Poliestireno (PS), Estireno acrilonitrilo (SAN), Acrilonitrilo butadieno estireno (ABS) y Policarbonato (PC) son dañinos para las personas, diversas especies de una comunidad biológica y el medio ambiente (Royte, 2019), ya que, al ser expuestos a temperaturas altas, generan subproductos tóxicos en el aire como metales, dioxinas, furanos, dióxido de carbono y gases ácidos (Honus et al., 2018; Verma et al., 2016). Debido a esto, es necesario que se reduzca la producción y consumo del plástico para evitar una mayor contaminación en el medio ambiente y daños tóxicos en el ser humano.

Tabla 1. Tipos de termoplásticos más comunes y sus aplicaciones.

Tipos de plásticos	Códigos de identificación	Propiedades	Aplicaciones	Usos después del reciclado
Tereftalato de polietileno (PET)		Poliéster obtenido de la policondensación de ácido tereftálico y etilenglicol. Presenta alta resistencia química e indeformabilidad térmica, es transparente y cristalino.	Botellas, envases y refuerzos para los neumáticos.	Bolsas, lonas, cuerdas, hilos, envases, etc.
Polietileno de alta densidad (HDPE)		Polímero termoplástico conformado por unidades de etileno. Es rígido, ligero, opaco, resistente y no presenta toxicidad.	Botellas y contenedores para productos de limpieza y de alimentos, juguetes, bolsas, embalajes.	Bolsas, contenedores, tubos y botellas para detergentes.
Policloruro de vinilo (PVC)		Producto de la polimerización del monómero de cloruro de vinilo. Cuenta con propiedades elásticas, se puede utilizar con solventes, es duro y flexible.	Tuberías, cables, envases, mangueras, revestimientos para suelos, productos de uso sanitario.	Tuberías, contenedores y vallas.
Polietileno de baja densidad (LDPE)		Pertenece a la familia de los polímeros olefinicos. Presenta características de suavidad y translucidez.	Bolsas, envases, tuberías de riego, cinta adhesiva y contenedores.	Bolsas, contenedores y tubos.

Polipropileno (PP)		Polímero cristalino, poco flexible, con excelente resistencia química y muy baja absorción de humedad. Obtenido de la polimerización del polipropileno.	Popotes, envases, bolsas, componentes eléctricos y piezas de automóviles.	Envases, textiles y cajas para transporte de productos.
Poliestireno (PS)		Polímero poco flexible, translúcido, resistente al agua y solventes orgánicos, Obtenido de la polimerización del estireno.	Envases para cosméticos y alimentos, imitación de cristal y juguetes.	Se utiliza como aislante térmico y para envases.
Poliestireno extendido (PS-E)		Polímero ligero, esponjoso, que absorbe energía y alta resistencia mecánica. Es un material plástico espumado, derivado del poliestireno.	Envases, aditamentos para construcción y utensilios de cocina.	Se utiliza como un aislante térmico y envases.
Otros (SAN, ABS, Nylon, PC)		Combinación de diversos plásticos. Sus propiedades dependen de la combinación de los plásticos.	Autopartes, envases, hielera, electrónicos y piezas para empaques.	Su reciclado debe ser con precaución, debido a que son dañinos para la salud.

Referencias

(Plastics Europe, 2021; Arepack, 2018; Envaselia, 2018; Gayer et al., 2017; American Chemistry Council, 2017; Plastics Europe, 2016).

1.2 Panorama general de la contaminación ocasionada por plásticos

Los plásticos son materiales económicos, livianos, fuertes, duraderos y resistentes a la corrosión, con altas propiedades de aislamiento térmico y eléctrico (Pérez, 2014; Vert, 2012; Hermida, 2011). La diversidad de los polímeros y la versatilidad de sus propiedades permite que sean utilizados en el sector industrial, médico, tecnológico y de uso cotidiano (Koelmans et al., 2014; Rillig, 2012; Andrady & Neal, 2009). En consecuencia, existe un aumento constante en la producción de estos materiales a nivel mundial, lo cual ocasiona un incremento en su consumo y una acumulación continua de desechos.

Aproximadamente 390.7 Mt de plástico se produjeron en el 2021; del cual el 90.2% representa al plástico de origen fósil, el 8.3% a plásticos reciclados y el 1.5% a bioplásticos (Plastics Europe, 2022). Es importante mencionar que en el 2021 la producción de plástico en China alcanzó el 32%, Japón el 3%, el resto de los países asiáticos un 17%, en América del Norte un 18%, Latinoamérica el 4% (Plastics Europe, 2021), como se muestra en la figura 2.

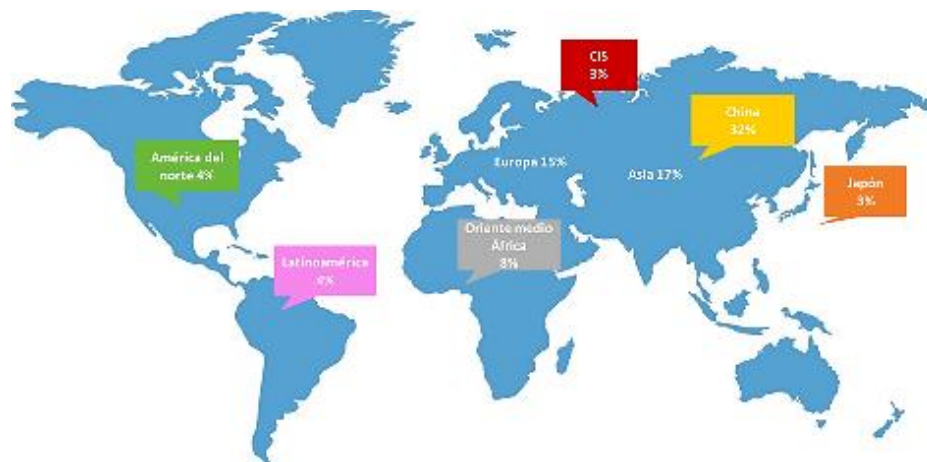


Figura 2. Principales países productores de plásticos a nivel mundial en el 2021. Editado de Plastics Europe, 2021.

La mayoría de los plásticos que se producen terminan desechándose en forma de basura, la cual se acumula en los vertederos o en los ecosistemas (Lehner et al., 2019; Phuong et al., 2016). De la basura de los vertederos se estima que cada año un total de 4 a 20 Mt de residuos plásticos acaban en los océanos (Toussaint et al., 2019; Geyer et al., 2017), lo cual representa el 85% de toda la basura marina (Thompson, 2022; Ericksen et al., 2014). Una de las alternativas para el manejo de la basura plástica, consiste en el reciclaje y la incineración. Se ha estimado que, en 2023, un 43.80% del plástico será desechado, un 31.10% incinerado y un 25.10% reciclado (figura 3) (Ritchie y Roser, 2018; Geyer et al., 2017). Sin embargo, la

manera más efectiva para abordar el problema de la acumulación de plástico consiste en reducir tanto la producción, como el consumo de plásticos y fomentar alternativas más sostenibles y biodegradables.

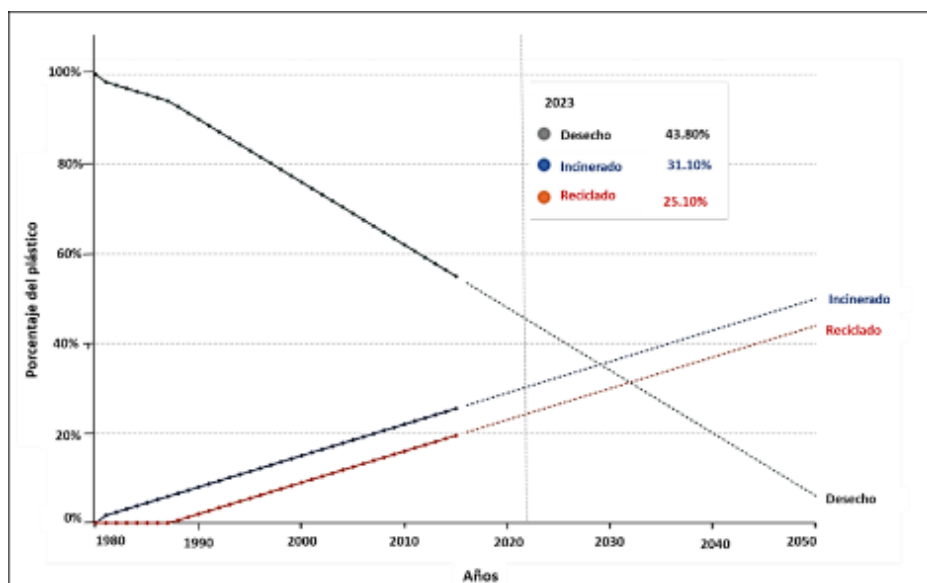


Figura 3. Datos extrapolados del porcentaje de plástico desechado, incinerado y reciclado en el 2023. Editado de Ritchie & Roser, 2018.

1.3 Policloruro de vinilo (PVC)

El PVC es un material económico y versátil que se utiliza en la construcción, electrónica, sector automotriz e industrial (ANIQ, 2022; Sadat-Shojai & Gholam-Reza, 2010; García et al., 2006; Titow, 1990). De acuerdo con la Asociación Nacional de la Industria Química (ANIQ), el PVC es un plástico que surge a partir de la polimerización de los radicales libres del monómero del cloro etileno, también conocido como cloruro de vinilo (figura 4) (ANIQ, 2022; Ureta, 1989). Los componentes principales del PVC se derivan del cloruro de sodio y del gas natural o del petróleo y su fórmula química se conforma por cloro, hidrógeno y carbono (ANIQ, 2022).

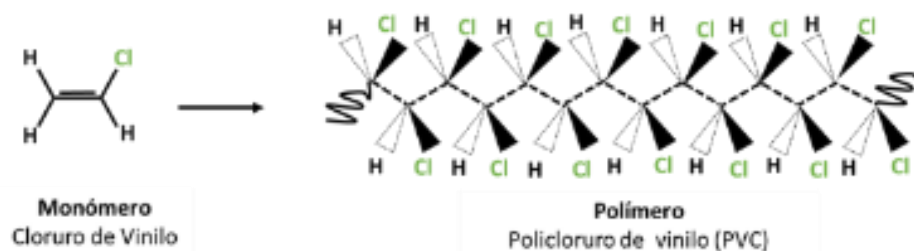


Figura 4. Fórmula química y proceso de polimerización del PVC. Editado de Chem Tube 3D, 2022.

El PVC posee las características de un material amorfo, aislante térmico, baja densidad, es químicamente inerte e inocuo, tiene buena resistencia mecánica, amplio rango de dureza y debido a la presencia de los átomos de cloro no se quema con facilidad ni causa combustión (Amer et al., 2013; Purmová, 2007; Rabek, 1995; Titow, 1990). Sin embargo, algunas de las desventajas del PVC es su susceptibilidad para degradarse al ser expuesto a altas temperaturas y durante su periodo de vida útil (Amer et al., 2013, Yamak, 2013).

Otra de las desventajas que posee el PVC es la presencia de las sustancias organocloradas en su composición, las cuales pueden ser liberadas durante la combustión. Un ejemplo de estas sustancias son las dioxinas, que se encuentran en el medio ambiente y se acumulan en el tejido adiposo de los animales (WHO, 2016). Las dioxinas cuentan con elevada toxicidad, son inductores enzimáticos, disruptores endócrinos, carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos. Esto origina problemas de reproducción y desarrollo, afecta al sistema inmunitario, interfiere en el proceso hormonal y en casos muy graves ocasiona cáncer (WHO, 2016; Prado, 2002).

Hoy en día el PVC es el segundo plástico más utilizado en el mundo; en el año 2021 su producción representó un 11.4% en el sector industrial (Plastics Europe, 2022). Entre los países europeos, Alemania fue considerado el país más avanzado respecto al reciclaje de este material (Sadat-Shojai y Gholam-Reza, 2010; Wenguang & la Mantia, 1996). En Alemania en el 2008, se reciclaron 194950 toneladas de PVC, lo que tan solo constituyó un 2.5% de porcentaje de reciclado con respecto a su producción (Sadat-Shojai & Gholam-Reza, 2010; García et al., 2006). De acuerdo con los datos obtenidos por la Asociación Nacional de Industrias del Plástico (ANIPAC), la producción del PVC en México oscila en 500 a 600 mil toneladas por año aproximadamente (Forbes, 2021). Desafortunadamente, no existen datos estadísticos que estimen la cantidad de residuos y el porcentaje que es reciclado. Esta cantidad de basura plástica tiene un gran impacto ambiental, ya que se estima que el PVC, tarda en degradarse aproximadamente de 100 a 1000 años (Cristán et al., 2003). Aunado a esto, recientemente se ha visto que estos materiales pueden fragmentarse por factores bióticos y/o abióticos dando origen a lo que se conoce como micro y nanoplásticos.

1.4 Micro y nanoplásticos

Los microplásticos (MPLs), se definen como pequeñas partículas de plástico que se encuentran entre las dimensiones de 0.1 μm a 5 mm (Hirty & Body, 2020; Ferreira et al., 2019; Alimi et al., 2018; Thompson et

al., 2004). Por otra parte, en el caso de los nanoplasticos (NPLs) algunos autores mencionan que tienen una dimensión de 1 nm a 100 nm (Ferreira et al., 2019; Alimi et al., 2018; Gigault et al., 2018; Klaine et al., 2012). En la tabla 2 se detallan algunas de las propiedades que definen a un nanoplastico.

Tabla 2. Propiedades que definen a los nanoplasticos. Recuperado de Gigault et al., 2018.

Composición	Propiedad de los nanoplasticos
Formación	No intencional.
Tamaño	1 nm a 100 nm.
Distribución de tamaño	Polidisperso (continuo de tamaño).
Forma	Asimétrica / Heterogénea.
Carga superficial	No controlada con presencia de diferentes especies (orgánicas e inorgánicas) y no homogéneo en la superficie de la partícula.
Estabilidad	La estabilidad de la partícula plástica depende sus propiedades fisicoquímicas. Durante el proceso de formación con coloides naturales y antropogénicos pueden formar hetero agregados.
Agregados	Se forman agregados fractales mediante el proceso de formación.
Porosidad	Estructura abierta, que se le atribuye al material y al proceso de formación.

1.4.1 Origen de los microplásticos y nanoplasticos

Los MPLs y NPLs pueden producirse ya sea a partir de un origen primario o secundario. El origen primario se ocasiona mediante los procesos de producción intencional; son las partículas que fabrican las industrias y poseen una aplicación específica en productos de higiene y belleza (Ferreira et al., 2019). Además, durante los procesos de refinación del petróleo se obtienen los residuos de las cadenas de carbono que, mediante los procesos térmicos y descomposición catalítica, generan una reducción de las cadenas de carbono y esto ocasiona la formación de los MPLs y NPLs (Kasar et al., 2020; Ferreira et al., 2019).

Por otra parte, el origen secundario es el resultado de la degradación y fragmentación de los MPLs (Rogers, 2020; Andrady, 2011). La alteración química provocada por exposición a luz ultravioleta (UV) conocida como fotodegradación, la biodegradación (originada por hongos, bacterias y crustáceos), los procesos mecánicos (abrasión marina y eólica), la inestabilidad del material, y las propiedades intrínsecas y fisicoquímicas del material promueven la formación de los MPLs y NPLs (Rogers, 2020; Ferreira et al., 2019; Lehner et al., 2019; Revel, 2018; Wright y Kelly, 2017), que se encuentran presentes en el ambiente acuático, aéreo y terrestre (Jin et al., 2019). Podemos ver la esquematización de este ciclo en la figura 5.

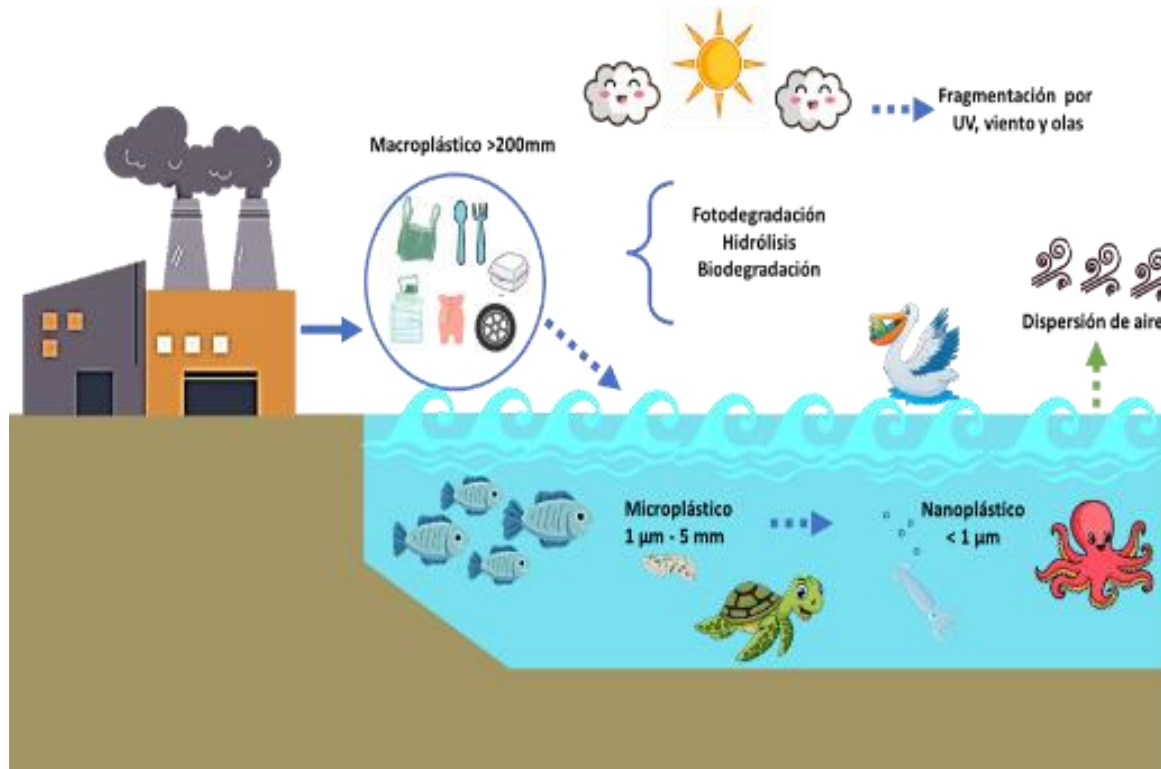


Figura 5. Proceso del origen de los micro y nanoplásticos. Elaboración propia en Canva, 2023.

1.4.2 Acumulación de micro y nanoplásticos en el medio ambiente

La creciente contaminación ocasionada por los MPLs y NPLs causa una constante preocupación en el sector social a nivel mundial. Esto se debe a que la liberación continua de las partículas plásticas en el medio ambiente tiene un gran impacto en los mantos acuíferos (lagos, ríos y océanos), en los ecosistemas terrestres y en el aire (Koelmans et al., 2022; Bellasi et al., 2021). Sin embargo, no se sabe con exactitud cómo es la interacción de las partículas plásticas en el ambiente y cuáles puedan ser sus efectos específicos en el ecosistema (Koelmans et al., 2022). En los últimos años los MPLs y NPLs provenientes de productos industriales (envases de alimentos, botellas de bebidas, textiles, envases de productos de cuidado personal, redes para pescar, bolsas de plástico, etc) se han encontrado en mayor proporción en playas y zonas costeras de Brasil, Hawái, Estados Unidos (Bellasi et al., 2021; Rey et al., 2021; da Costa et al., 2016; Rosevelt et al., 2013).

1.4.3 Introducción de los micro y nanoplásticos en la cadena trófica

En la actualidad, existe la preocupación por el uso inadecuado de los MPLs y NPLs y sus posibles efectos al introducirse en el ecosistema y a la cadena trófica (Koelmans et al., 2022; Law, 2017). La ubicuidad de los plásticos implica que diferentes organismos puedan estar en contacto directo con estos materiales, e incluso puedan ser ingeridos por los consumidores primarios (zooplancton, microalgas y fitoplancton), los cuales sirven como alimento de diferentes organismos como los anfípodos, arenícolas, percebes, mejillones, crustáceos decápodos, aves, peces y ballenas (Carbery et al., 2018; Cole et al., 2015; Koelmas et al., 2014, von Moos et al., 2012).

Por ahora no se sabe con certeza qué sucede con los plásticos en el organismo de los diferentes hospedadores, se tiene la hipótesis de que los MPLs y NPLs no se degradaran, por lo consiguiente se acumularan en diferentes partes del organismo. Esto ocurre porque las partículas plásticas incrementan su reactividad a causa del aumento del área superficial (Rodríguez- Hernández et al., 2019). Diversos estudios realizados en diferentes organismos han demostrado que los MPLs y NPLs se pueden absorber o acumular dependiendo del tamaño. Los MPLs que tienen un tamaño mayor a 150 μm no se absorben y permanecen unidos al epitelio. Sin embargo, las partículas de 2 μm logran atravesar el epitelio mediante los mecanismos de endocitosis, transcitosis y captación celular. Por ende, pueden llegar a diferentes órganos como el hígado, bazo, corazón, pulmones, riñones y cerebro (Hirt & Body, 2020; Bouwmeester et al., 2015).

1.4.4 Vías de exposición de los micro y nanoplásticos en el ser humano

Existen pocos estudios que indiquen los riesgos que pueden originar las partículas plásticas al interactuar con el ser humano. Es importante mencionar, que las personas se encuentran expuestas a los MPLs y NPLs por diferentes vías como la oral, cutánea y aérea (Lehner et al., 2019). Esto podemos visualizarlo de manera más clara en la figura 6.

Las partículas plásticas que se encuentran por la vía de exposición aérea son el PS, HDP, LDP PVC, PP y PET, que provienen de la erosión de diferentes materiales sintéticos como los neumáticos de caucho, polvo, tejidos, etc (Hirt and Body, 2020). Se ha demostrado que los MPLs y NPLs pueden ingresar al

sistema respiratorio del ser humano, lo cual se atribuye al tamaño de estas partículas (Lehner et al., 2019; Valera et al., 2012; Salvati et al., 2011).

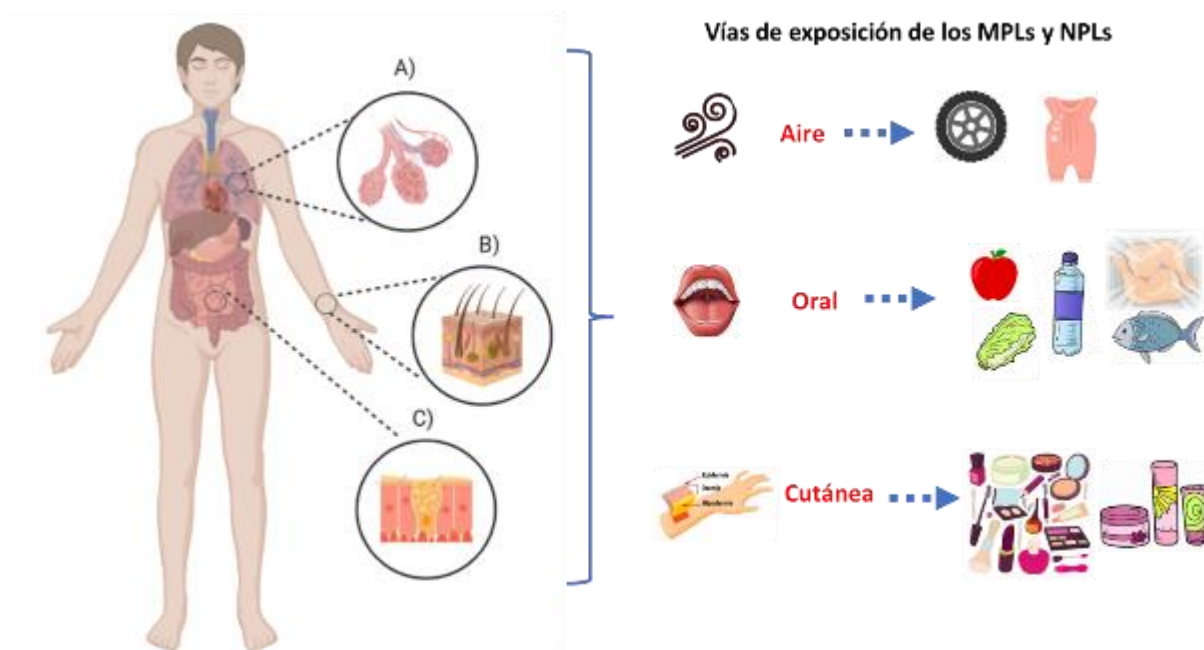


Figura 6. Ilustración esquemática que muestra las vías de exposición humana de los MPLs y NPLs, a través del (A) aire (el pulmón), (B) vía oral (tracto gastrointestinal) y (C) la vía cutánea (piel). Elaboración propia en BioRender y Canva, 2023.

Con respecto a la exposición por vía oral, se han encontrado MPLs y NPLs en productos de consumo diario como el agua embotellada, miel, frutas y verduras (manzana, zanahoria, lechuga, papa, brócoli, etc), animales marinos (pescado, crustáceos y moluscos), azúcar, cerveza, sal, leche, bebidas energéticas, carne empaquetada y comida enlatada (Paul et al., 2020; Toussaint et al., 2019; Lehner et al., 2019; Carbery et al., 2018; Revel, 2018; Cole et al. 2015; Koelmas et al., 2014). La ingesta de estos alimentos ha ocasionado que el ser humano alcance un consumo de 5 gramos de plástico a la semana (WWF, 2019).

Aunque, los MPLs y NPLs están presentes en diferentes ambientes, el ser humano acumula mayoritariamente estas partículas en su sistema gastrointestinal al introducirse por vía oral (Koelmans et al., 2022; Hirt & Body, 2020; Lehner et al., 2019). La evidencia de ingesta de MPLs se sustenta en la presencia de estos en las heces fecales (Zhang et al., 2021; Schwabl et al., 2019).

Recientemente, en la placenta humana de las mujeres embarazadas se han encontrado MPLs con morfología esférica o irregular y con un tamaño del orden de 5 a 10 μm . De acuerdo con los autores es

posible que el transporte de los MPLs sea por vía sanguínea, sin embargo, se desconoce la vía de ingreso de las partículas plásticas al organismo (Ragusa et al., 2021).

También, se ha demostrado que las partículas plásticas están biodisponibles en el torrente sanguíneo humano lo que puede facilitar su absorción. En uno de los estudios realizados, se identificaron y cuantificaron 1.6 µg/mL partículas de plástico en la sangre de pacientes de diferentes polímeros como el tereftalato de polietileno, el polietileno y los estirenos (poliestireno, poliestireno expandido, acetonitrilo butadieno y estireno) (Leslie et al., 2022).

1.4.5 Interacción de los micro y nanoplásticos en el cerebro

Hasta el momento, se dispone de poca información sobre los efectos originados por los MPLs y NPLs en el tejido cerebral. Algunos de los estudios se han enfocado en la interacción y los daños que ocasionan los MPLs y NPLs en los modelos *in vitro* e *in vivo* del cerebro.

La evidencia actual indica que, los MPLs y NPLs pueden ser absorbidos por los mamíferos tanto acuáticos como terrestres. Tras su absorción, los MPLs y NPLs podrían llegar al cerebro. Sin embargo, existe poca información sobre la cantidad de partículas que ingresan al cerebro y la posible neurotoxicidad que esto puede originar (Prüst et al., 2020). Uno de los estudios realizados en mamíferos expuestos a NPLs, reporta que estas partículas se acumulan en el tracto gastrointestinal lo cual genera disbiosis, translocación a múltiples órganos y atraviesan barreras biológicas como la barrera de sangre placentaria y la barrera hematoencefálica (BHE), para finalmente ingresar al cerebro (Grodzicki et al., 2021). Un resumen de los efectos generados por la exposición a NPLs se muestra en la figura 7.

Además, algunos autores indican que la exposición a los NPLs y MPLs genera una toxicidad aguda en el sistema nervioso, alteraciones de comportamiento, neuroinflamación y cambios en los niveles de los neurotransmisores (Grodzicki et al., 2021; Prüst et al., 2020; Yon et al., 2020).

En estudios *in vitro* se ha demostrado que los MPLs y NPLs se internalizan en líneas celulares asociadas al cerebro, lo que provoca una reducción en la viabilidad celular, estrés oxidativo, daño en la actividad mitocondrial y cierta alteración de la expresión génica (Grodzicki et al., 2021; Prüst et al., 2020; Schirinzi, et al., 2017; Hoelting et al., 2013). Estos efectos generados causan daño celular y trastornos neuronales

que se atribuyen a la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa y la alteración de los niveles de neurotransmisores (Prüst et al., 2020; Yon et al., 2020).

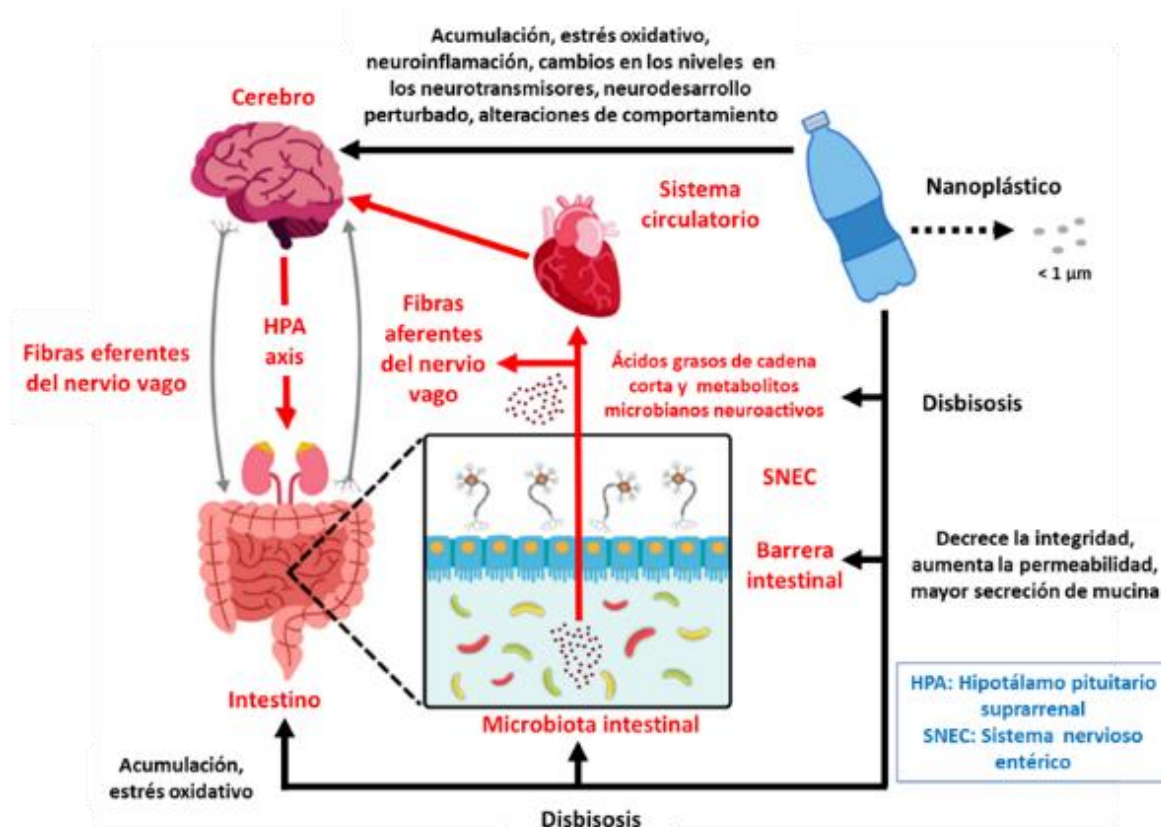


Figura 7. Esquema que ilustra el impacto de la exposición a nanoplasticos en el eje intestino-cerebro. Editado de Grodzicki et al., 2021.

A diferencia de los MPLs y NPLs, se ha reportado que las nanopartículas (NPs) de oro, plata, dióxido de titanio, óxido de zinc, poliméricas y liposomas, ingresan al cerebro cuando cruzan la BHE, lo que genera efectos neurotóxicos, daño estructural en la BHE y formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lui et al., 2017; Disdier et al., 2015; Ze et al., 2014), que se atribuyen a las propiedades fisicoquímicas de las NPs (Boyes & van Thriel, 2020; Prüst et al., 2020; Borisova, 2018; Dumková et al., 2017; Win & Fujimaki, 2011).

Hoy en día, existe poca información sobre los NPLs; debido a ello es necesario el diseño de NPLs que sirvan como modelos para estudiar su presencia en el ambiente y los efectos que ocasiona en células, tejidos y microorganismos.

1.5 Barrera hematoencefálica

La barrera hematoencefálica (BHE) es uno de los mecanismos de protección más esenciales del sistema nervioso central (SNC) (Zhou et al., 2018). La BHE es una barrera de permeabilidad altamente selectiva que se encarga de separar la sangre que circula del líquido extracelular del cerebro en el SNC de la mayoría de los vertebrados incluidos: anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Dai et al., 2018; Zhou et al., 2018; de Boer & Gaillard, 2006).

Es importante destacar que, la BHE cuenta con tres funciones principales: proteger al cerebro de compuestos y moléculas circulantes en el torrente sanguíneo; permitir el transporte selectivo desde la sangre hasta el cerebro, así mismo permite el transporte de moléculas necesarias para el funcionamiento del cerebro (oxígeno, glucosa, aminoácidos, nutrientes esenciales) y se encarga de metabolizar elementos de la sangre hacia el tejido nervioso (Escobar & Gómez, 2008).

Debido a las características que presenta la BHE, solamente el agua, gases y determinadas sustancias liposolubles y de pequeño peso molecular (400-600 Da) son capaces de atravesar la BHE, mediante difusión pasiva; por lo consiguiente, el resto de las sustancias con alta carga eléctrica, polaridad e hidrofílicas, requieren de receptores o transportadores específicos para atravesar la BHE, para ello se utiliza el mecanismo de transporte activo (Annu et al., 2022; Cabrera-Maqueda et al., 2018; Milojkovic-Kerklaan, 2016; Montiel-Eulefi, 2011). Así mismo, la BHE utiliza diferentes mecanismos de transporte para regular el paso de sustancias y moléculas entre la sangre y el tejido nervioso. Algunos de los tipos de transporte en la BHE incluyen la penetración por caveolas y transitocis, la difusión transmembranal, mecanismos de acarreo y transportadores y transporte por vía retrógrada de flujo axónico (Escobar & Gómez, 2008).

La BHE es una estructura microvascular, constituida por las células endoteliales, pericitos, astrocitos, neuronas, membrana basal y los complejos de unión, ver figura 8 (Neumair et al., 2021; Luissint et al., 2012; Snell, 2007; de Boer y Gaillard, 2006). Es importante mencionar que, las uniones estrechas en el endotelio se encargan de proteger al cerebro y regular el paso selectivo de moléculas y sustancias entre la sangre y el tejido nervioso. Las uniones estrechas en el endotelio están molecularmente asociadas con tres proteínas integrales de la membrana como la claudina, ocludina y moléculas de adhesión de la unión. Además, se encuentran las proteínas citoplasmáticas accesorias como ZO1, ZO2, ZO3 y cingulina (Luissint et al., 2012; Escobar & Gómez, 2008).

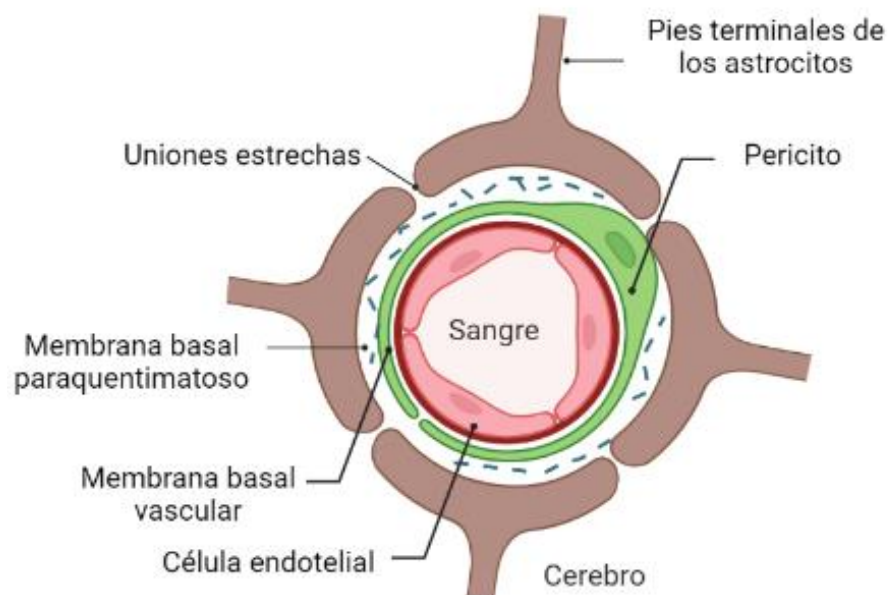


Figura 8. Esquema de la barrera hematoencefálica. Elaboración propia en BioRender, 2023.

1.6 Pericitos vasculares del cerebro humano

Los pericitos también conocidos como células murales son células multipotenciales que surgen de las células mesenquimáticas, que derivan del mesodermo (Hirschi y D'Amore, 1996), (figura 9). Los pericitos vasculares del cerebro humano (HBPV) son células perivasculares que se encuentran en el endotelio de los capilares y vasos sanguíneos (Mathiisen et al., 2010). Los pericitos constituyen el 20% de la superficie externa de las células endoteliales (Mathiisen et al., 2010; Armulik et al., 2005). Los HBPV contienen bandas de miofilamentos que se encuentran en el endotelio de la célula, poseen un cuerpo celular con un núcleo que contiene heterocromatina y ocasionalmente un nucleolo (Mandarino et al., 1993). La interfase de los HBPV tiene centriolos adyacentes al núcleo que unen a los microtúbulos (Mathiisen et al., 2010; Mandarino et al., 1993). Además, en los HBPV está presente el aparato de Golgi con moderada cantidad del retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias, extensiones citoplasmáticas, lisosomas, depósitos de glucógeno y lípidos (Stratman et al., 2009; Mandarino et al., 1993; Cohen et al., 1980). Los HBPV sirven de soporte en la BHE, medio de comunicación entre las células endoteliales, participan en la angiogénesis y se encargan de la regulación del flujo sanguíneo en el capilar cerebral (Jespersen & Østergaard, 2012; Rucker et al. 2000).

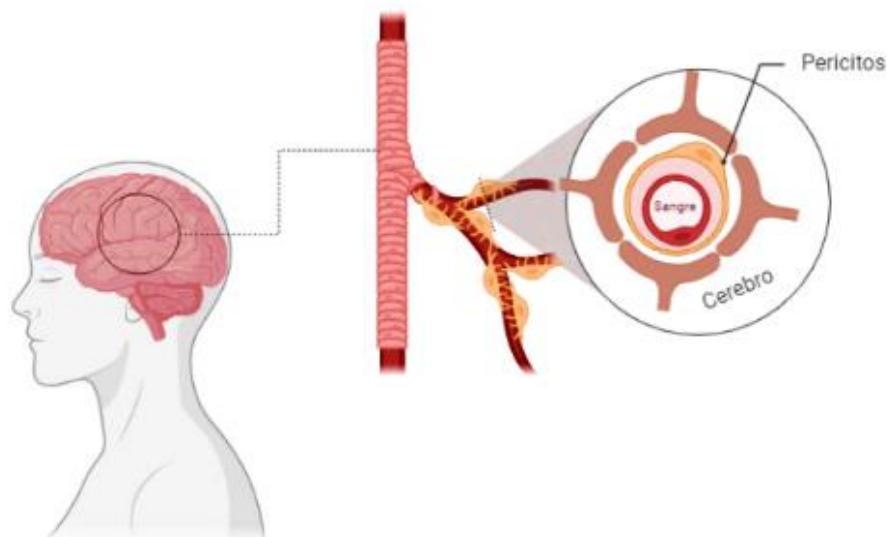


Figura 9. Esquema del sistema vascular cerebral, que ilustra en donde se encuentran los pericitos vasculares del cerebro humano. Elaboración propia en BioRender, 2023.

1.7 Antecedentes

Poco se ha descrito sobre los efectos tóxicos que originan los MPLs y NPLs. En particular no existen estudios sobre la evaluación del efecto citotóxico de las NPs de PVC en la línea celular de pericitos vasculares del cerebro humano. Sin embargo, existen estudios previos de la evaluación de los NPLs o MPLs de polietileno (PE), tereftalato de polietileno (PET), polimetilmetacrilato (PMMA), poliestireno (PS) y policloruro de vinilo (PVC), que serán de gran utilidad para esta investigación.

Uno de los primeros estudios fue el de Hoelting et al., (2013), quienes sintetizaron NPLs de PE de un tamaño de 33 nm y un potencial zeta de -30 mV mediante un proceso de microemulsión. Estos NPLs de PE fueron evaluadas en cultivos *in vitro* de precursores neuronales humanos (Mesencéfalo humano de Lund, LUHMES) y neuroesferas. Los autores indican que la concentración efectiva para la toxicidad aguda a 48 horas es de 257 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual genera un daño en el ATP intracelular. En cambio, con una concentración de 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$, observaron una internalización de las partículas plásticas en las neuroesferas mediante el análisis de fluorescencia.

Murali et al., (2015) investigaron los efectos ocasionados de las NPs envejecidas y sin tratamiento de PS carboxiladas (COOH) y las PEGiladas (PEG) en cinco tipos de células neuronales (neuronas derivadas de

las células madre, astrocitos primarios, cultivos de células cerebrales primarias enriquecidas con neuronas, células de microglía y células endoteliales microvasculares cerebrales). Las NPLs de PS que analizaron eran de un tamaño de 55 ± 10 nm, morfología esférica y los potenciales zeta para las NPLs de PS-COOH y PS-PEG fueron de -35.4 ± 0.5 mV y -14.8 ± 1.0 mV respectivamente. Las concentraciones de $125 \mu\text{g/mL}$ y $250 \mu\text{g/mL}$ de las NPLs de PS causaron un efecto citotóxico y un daño metabólico en las células. Con las concentraciones $7.8 \mu\text{g/mL}$, $15.6 \mu\text{g/mL}$, $31.2 \mu\text{g/mL}$, $62.5 \mu\text{g/mL}$, $125 \mu\text{g/mL}$ y $250 \mu\text{g/mL}$, no observaron daños morfológicos en las células neuronales. Sin embargo, con microscopía confocal se reveló que las NPLs de PS-COOH internalizaban en las células microgliales mediante el proceso de fagocitosis.

Por otro lado, Schirizzi, et al., (2017), evaluaron las células provenientes del glioblastoma humano (T98G) y las células del adenocarcinoma cervical humano (HeLa) en presencia de MPLs de PS y PE de un tamaño de 3 a $16 \mu\text{m}$ y $10 \mu\text{m}$ respectivamente. Los principales resultados fueron una reducción significativa en la viabilidad celular de ambos MPLs en concentraciones de 10 ng/mL hasta $10 \mu\text{g/mL}$ por un lapso de 24 horas. Con una concentración de 10 mg/mL para los MPLs de PS, los autores vieron una mayor producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), lo cual atribuyeron al tamaño de las partículas.

Jung et al., (2020), analizaron las NPLs de PS de un tamaño de 100 nm y un potencial zeta de -40.60 ± 3.96 mV en las líneas celulares murinas (fibroblastos embrionarios de ratón MEF), células neuronales provenientes de la corteza embrionaria y astrocitos corticales. La exposición de las NPs de PS a una concentración de 200 mg/L con el ensayo de MTT no generó un efecto en la viabilidad celular en los MEF y los astrocitos corticales. En cambio, en las células neuronales con una concentración de 100 mg/L se redujo significativamente la viabilidad celular.

Recientemente, Mahadevan & Valiyaveetti, (2021), sintetizaron por el método de nanoprecipitación las NPs de PVC luminiscentes y NPs de PMMA, con el objetivo de estudiar la absorción, translocación y toxicidad en la línea celular de fibroblasto de pulmón humano. El tamaño de las partículas fue de 122 ± 04 nm para PVC y 144 ± 4.34 nm para PMMA. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de Alamar Blue, en donde se presentó una reducción al 78% para las NPs de PVC y al 82% para las NPs de PMMA después de 48 horas a una concentración de $200 \mu\text{g/mL}$. Después de 72 horas la viabilidad disminuyó a 35% y 60% para las NPs de PVC y PMMA, respectivamente. En cuanto a las pruebas de dynamin inhibitor se encontró que las nanopartículas de PVC y PMMA pueden entrar a la célula mediante el mecanismo de endocitosis. También las partículas plásticas analizadas originaron una disminución del adenosine

triphosphate, un aumento del ROS, altas concentraciones de lactato deshidrogenasa y la detención del ciclo celular en las fases sub-G1, G0/G1 y G2/M, seguidas de muerte celular apoptótica en la línea celular de fibroblasto de pulmón.

Finalmente, en el trabajo de Aguilar-Guzmán et al., (2022), obtuvieron NPs de PET de un tamaño ≤ 250 nm por el método de disolución y precipitación con ácido tricloroacético (TFA), con el objetivo de evaluar los posibles efectos toxicológicos en la línea celular de macrófagos de ratón (RAW 246.7). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de Alamar Blue, en donde se presentó un incremento en la reducción de resazurina en las concentraciones de 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL, 1 mg/mL. Siendo que, la mayor reducción se observó entre las concentraciones de 10-100 μ g/mL. Sin embargo, el recuento de células mostró una tendencia diferente, especialmente a las 48 y 72 horas, donde se detectaron menos células con las NPs de PET. Además, con los ensayos de internalización que se llevaron a cabo utilizando imágenes de microscopía confocal y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las imágenes del microscopio confocal mostraron la presencia de las nanopartículas de PET dentro de las células, colocalizadas con las especies reactivas de oxígeno (ROS) y cerca del núcleo celular. Por otro lado, las imágenes en TEM revelaron la presencia de las nanopartículas de PET a las 24, 48 y 72 horas de incubación, donde se observó que la fagocitosis parece ser el mecanismo de internalización de las nanopartículas de PET por parte de las células macrofágicas, respaldado por la elongación de la membrana celular que envuelve los conglomerados de nanopartículas y la presencia de partículas en vesículas.

Actualmente, la investigación *in vitro* que explora la toxicidad de los NPLs y MPLs con respecto a las células del SNC aún es escasa. Los pocos estudios que existen han utilizado diferentes tipos, tamaños y concentraciones de los NPLs o MPLs. Estas investigaciones comparten ciertos puntos en común, lo que permite cierta generalización. Los NPLs o MPLs en las líneas celulares que se han estudiado pueden internalizarse, provocar ROS, generar un efecto citotóxico dependiente a las concentraciones de los NPLs y MPLs (tabla 3).

Tabla 3. Resumen de las investigaciones relacionadas con la toxicidad de MPLs y NPLs en ensayos *in vitro*, en diferentes líneas celulares y con diferentes tipos de plásticos.

MPLs/NPLs	Tamaño de MPLs y NPLs	Líneas celulares	Observaciones	Referencias
NPLs de PE	33 nm	Mesencéfalo humano de Lund. Neuroesferas.	<ul style="list-style-type: none"> • Internalización en la estructura tridimensional de las neuroesferas, producción de ROS y alteración en la expresión génica. • Toxicidad dependiente de la concentración. 	(Hoelting et al., 2013)
NPLs de PS	55 ± 10 nm	Neuronas derivadas de las células madre. Astrocitos primarios. Células cerebrales primarias enriquecidas con neuronas. Células de microglía. Células endoteliales microvasculares cerebrales.	<ul style="list-style-type: none"> • Daño en la actividad metabólica en las células. • Efecto citotóxico a concentraciones altas de las NPs de PS. • Las NPs de PS-COOH internalizaron a las células microgliales mediante el proceso de fagocitosis. 	(Murali et al., 2015)
MPLs de PS y MPLs de PE	3 a 16 µm y 10 µm	Glioblastoma humano (T98G). Adenocarcinoma cervical humano (HeLa).	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción significativa en la viabilidad celular de ambos MPLs en concentraciones de 10 ng/mL y 10 µg/mL por un lapso de 24 horas. • Generación de ROS en altas concentraciones en los MPLs de PS con una concentración de 10 mg/mL. 	(Schirinzi, et al., 2017)
NPLs de PS	100 nm	Fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). Células neuronales provenientes de la corteza embrionaria. Astrocitos corticales.	<ul style="list-style-type: none"> • No se presentó un efecto citotóxico en los MEF y los astrocitos corticales 200 mg/mL. • Con 100 mg/mL se redujo la viabilidad celular en las células neuronales. 	(Jung et al., 2020)
NPs de PET	≤250 nm	Línea celular de macrófagos de ratón (RAW 246.7)	<ul style="list-style-type: none"> • Se presentó un incremento en la reducción de resazurina en mayor proporción entre las concentraciones de 10-100 µg/mL. • Las imágenes del microscopio confocal mostraron la presencia de las NPs de dentro de las células, colocalizadas con las especies reactivas de oxígeno (ROS) y cerca del núcleo celular. • Las NPs de PET internalizaron a las células mediante el proceso de fagocitosis. 	(Aguilar-Guzmán et al., 2022)
NPs de PVC y NPs de PMMA	122 ±04 nm y 144±4nm	Fibroblasto de pulmón humano.	<ul style="list-style-type: none"> • Con 200 µg/mL la viabilidad celular a las 48 horas se redujo un 78% para NPs de PVC y un 82% para NPs de PMMA. • En las 72 horas se redujo un 35 % para las NPs de PVC y el 60 % en las NPs de PMMA. • Internalización por endocitosis. 	(Mahadevan & Valiyaveetti, 2021)

1.8 Justificación

La versatilidad y bajo costo de producción de los plásticos ha ocasionado un aumento en su producción anual, lo cual conlleva a un incremento de desechos y contaminación en el ambiente, afectando en mayor proporción a los mantos acuíferos y a los organismos que ahí habiten, así como al ser humano. La presencia de estos desechos en el ambiente, su manejo inadecuado y su degradación ha provocado una acumulación de lo que hoy se conoce como micro y nanoplásticos, esto ha generado una preocupación a nivel global por los posibles impactos a los ecosistemas y a la salud pública. Hoy en día el PVC es uno de los polímeros más producidos y por consecuencia una alta producción de desechos que son dispersados en el ambiente, lo cual representa un riesgo importante para los ecosistemas y el ser humano. Debido a que los microplásticos han sido identificados en la sangre y en la placenta humana, haciendo evidente que estos pueden atravesar barreras fisiológicas, es importante conocer los efectos de estos materiales en una escala menor, por lo que esta investigación se enfocará en el estudio de las interacciones y efectos de las NPs de PVC al estar en contacto con la línea celular de pericitos vasculares humanos (HBVP-3D).

1.9 Hipótesis

Las nanopartículas de policloruro de vinilo (NPs de PVC) causaran alteraciones en las funciones básicas celulares de los pericitos vasculares del cerebro humano (HBPV -3D); afectando su viabilidad.

1.10 Objetivos

1.10.1 Objetivo general

Obtener, caracterizar y evaluar el efecto citotóxico de las nanopartículas de policloruro de vinilo en un modelo *in vitro* de la línea celular pericitos vasculares del cerebro humano.

1.10.2 Objetivos específicos

- Establecer la estrategia para la producción de nanopartículas de policloruro de vinilo mediante la técnica top-down.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de policloruro de vinilo.
- Evaluar el efecto citotóxico de las NPs de PVC en la línea celular HBVP-3D.
- Estudiar la internalización de las NPs de PVC en los HBPV-3D.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Preparación de las NPs de PVC

Para la fabricación de las NPs de PVC, se utilizó el procedimiento descrito por Rodríguez- Hernández et al., (2019), con las siguientes modificaciones. Utilizando una sierra de acero inoxidable, se obtuvo viruta del tubo de PVC. Las partículas obtenidas fueron tamizadas con una malla (mesh No.35, Cole-Parmer Testing Sieve), para obtener 100 mg de viruta de un tamaño aproximado de 20 μm .

Posteriormente, la viruta de PVC se sometió a un proceso de envejecimiento con luz UV (15 minutos) y esterilización en autoclave (121°C por 20 minutos). La viruta envejecida se diluyó con tetrahidrofurano (THF) al 99.9% en 10 mL volumen de la marca Sigma Aldrich, adicionando previamente 1 g de dodecilsulfato de sodio (SDS) a 50°C en agitación constante por un lapso de 2 horas. Pasado el tiempo se mantuvo en agitación por un lapso de 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se preparó una solución con dimetilsulfóxido (DMSO) al 65% y cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 0.1M. Después de 15 minutos, se adicionó por goteo la solución de PVC/THF y se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente por un lapso de 18 horas. Más tarde, se centrifugó la muestra a 7000 rpm por 30 minutos a 4 °C para eliminar los residuos de los solventes.

Enseguida, se resuspendió el pellet en 100 mL de H_2O Milli-Q y fue ultrasonicado por un 1 minuto con un Ultrasonic homogenizer sound arrest (YM-1000 Y) a 220 V, una amplitud del 25%, con intervalos de 9.9 segundos sonicación/descanso. Posteriormente de la sonicación, la muestra fue vertida en una probeta de 50 mL, la cual se aforó con H_2O Milli-Q, generando la suspensión de las NPs de PVC. La probeta fue recubierta con papel Parafilm, para ser agitada vigorosamente durante 10 segundos y se dejó reposar durante la noche. Para determinar el tamaño de las NPs de PVC se extrajeron alícuotas de 1 ml de la probeta a diferentes alturas, las cuales se analizaron por dispersión dinámica de luz (DLS). Las fracciones de la suspensión de las NPs de PVC que tuvieron un tamaño de 100 a 250 nm se centrifugaron con las mismas condiciones antes mencionadas. Las NPs de PVC se lavaron con ácido acético al 5% y etanol absoluto mediante un proceso de sonicación con las condiciones antes mencionadas y centrifugación por un lapso de 30 minutos a 14000 rpm. Por último, a la muestra se le adicionó 100 μL de etanol absoluto y se secó a una temperatura de 60°C. El proceso de la síntesis se muestra en la figura 10.

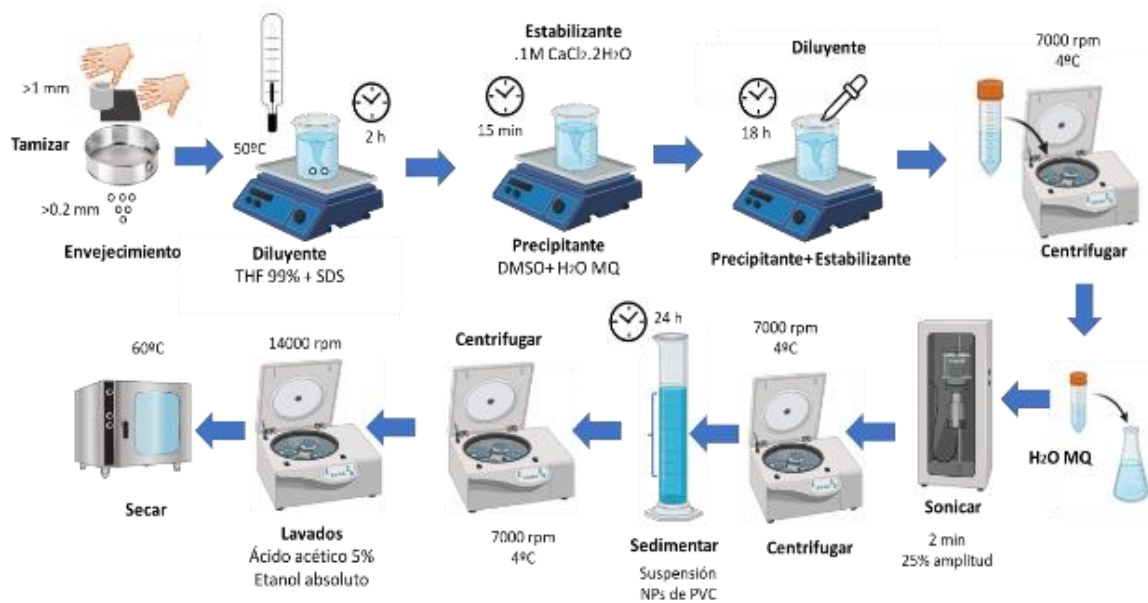


Figura 10. Proceso para la obtención de las NPs de PVC. Elaboración propia en BioRender, 2023.

2.2 Caracterización de las NPs de PVC

2.2.1 Microscopía Electrónica de Transmisión

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) es un método analítico utilizado en el área de la física, química y biológica (Nasrollahzadeh et al., 2019) y que utiliza un haz de electrones de una densidad de energía de 60 a 300 keV para visualizar una muestra ultrafina (Ford,2023; Tang & Yang, 2017; Reimer & Kohl,2008; Stachowiak et al., 2004). En la figura 11 se muestra el esquema del principio operativo del TEM.

El principio básico del TEM se fundamenta por la interacción de los electrones con la materia (Inkson, 2006). Los electrones son una radiación ionizante, que, al transferir energía a los átomos de una muestra, eliminan los electrones de la capa interna de los otros átomos que se encuentran unidos a su núcleo. Una de las ventajas del uso de la radiación ionizante, es su producción de las diferentes señales que se generan cuando el haz de electrones de alta energía interactúa con una muestra, es importante mencionar que estas señales se pueden detectar en el TEM (Williams & Carter, 2009) (figura 11). Con las señales generadas por el haz de electrones de alta energía que son transmitidos, se crea una imagen de la muestra analizada. El TEM puede obtener imágenes de campo claro y oscuro (Tang & Yang, 2017; Williams & Carter, 2009).

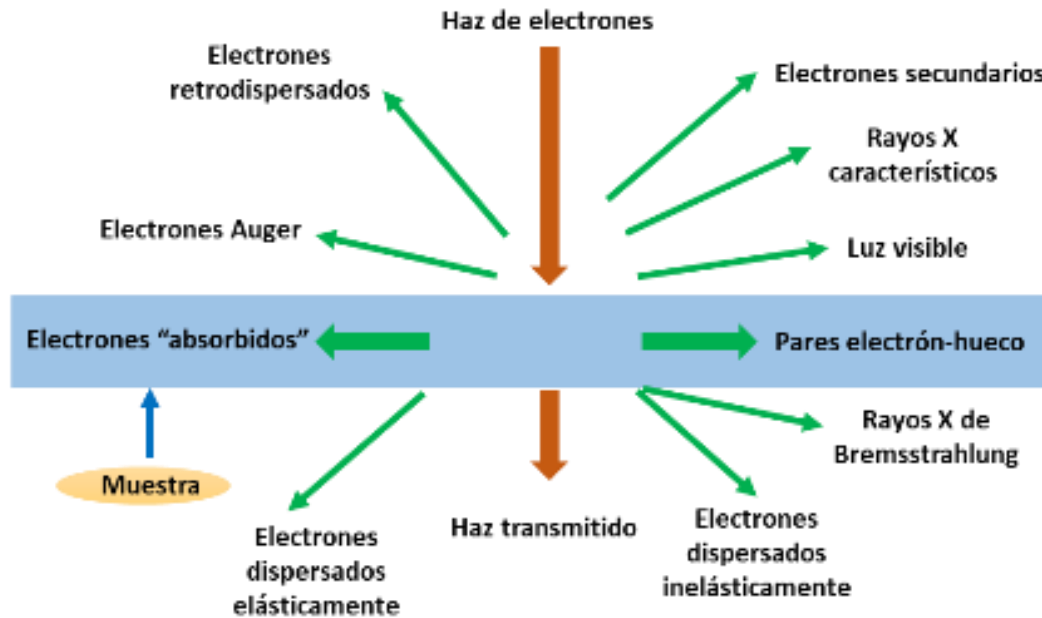


Figura 11. Señales que genera el haz de electrones de alta energía al interactuar con una muestra. Editado de Williams & Carter, 2009.

Para la caracterización de las NPs de PVC se depositaron 1 μg de NPs de PVC en 1 mL de alcohol etílico absoluto, la muestra fue ultrasonicada por un lapso de 10 segundos a 220 V, una amplitud del 25%, con intervalos de 9.9 segundos sonicación/descanso. Después de ese tiempo, se depositaron 5 μL de la solución en una rejilla (300 mesh formar/carbon film) y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra se analizó en un TEM modelo JEOL TEM JEM-2010. Las micrografías obtenidas, se analizaron y editaron en el software Image J y Fiji.

2.2.2 Espectroscopía de difracción de rayos X (DRX)

La espectroscopía de difracción de rayos X (DRX) es un análisis cualitativo no destructivo de mezclas puras y de múltiples compuestos o elementos como minerales, aleaciones, metales, materiales catalíticos, ferroeléctricos, luminiscentes, etc. (Aparicio & Carbajal, 2021; Khan et al, 2020; Hull, 1919). Cuando un haz de rayos X incide sobre el material cristalino, se forman patrones de difracción que permiten analizar las características fisicoquímicas y estructurales como son las fases cristalinas, fases de la red, tamaño promedio de grano, grado de cristalinidad y defectos cristalinos (Khan et al., 2020; Abhilash et al., 2016).

Los rayos X son una radiación de ondas electromagnéticas constituidas por fotones de alta energía, que se encuentran entre el rango de 100 eV y 100 keV, ubicándose en las radiaciones ionizantes (Caranza et al.,

2014, Salamon et al., 1988). Cuando los fotones de radiación interactúan con la materia, ocurren diferentes tipos de interacciones como la elástica (energía que no se absorbe e incide en el material) y la inelástica (energía que es absorbida por el material) (Nambiar & Yeow, 2012). Es importante mencionar que, durante la interacción de la radiación con el material se produce la absorción de la energía, se dispersa la radiación en diferentes direcciones y se atenúa la intensidad de la radiación incidente. Por lo tanto, cuando el haz de rayos X incide a la muestra, se reduce la intensidad (Nambiar & Yeow, 2012; Dinnebier & Billinge, 2008).

El principio básico del DRX es el estudio de la difracción de los rayos X de una estructura cristalina o amorfa (Khan et al., 2020; Abhilash et al., 2016). Los rayos X se difractan en las capas atómicas o moleculares de la estructura, obteniendo un patrón de difracción, que se explica mediante la ley de Bragg (Spieß et al., 2019; Abhilash et al., 2016), el fenómeno físico se observa en la figura 12. La ley de Bragg nos indica el orden de difracción, la distancia entre los planos cristalinos, la longitud de onda y el ángulo del haz incidente (Aparicio & Carbajal, 2021; Khan et al., 2020; Spieß et al., 2019; Abhilash et al., 2016).

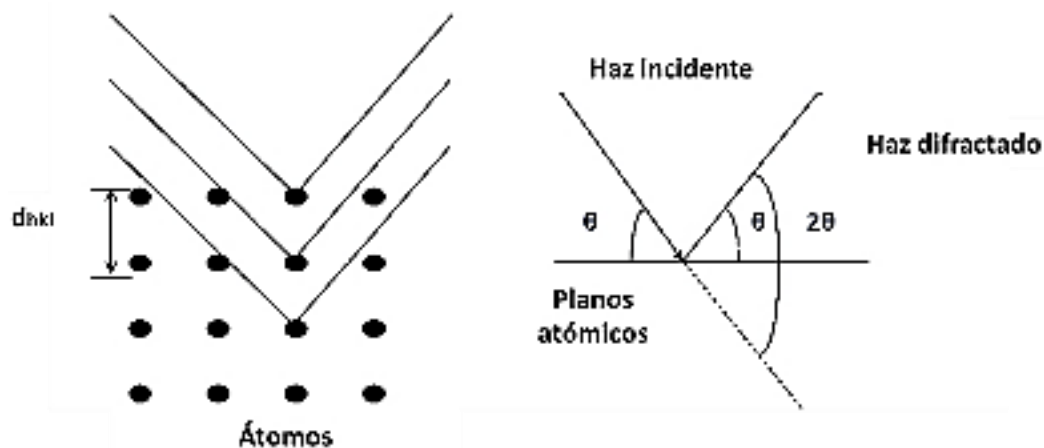


Figura 12. Principio de Difracción de Rayos X. Editado de Abhilash et al., 2016.

La caracterización de las NPs de PVC se realizó con un difractómetro Philips modelo X'Pert y un goniómetro PW3050/60. Se analizaron las muestras del tubo de PVC, el PVC con el proceso de envejecimiento y las NPs de PVC. Los parámetros utilizados fueron: Un ángulo de 10° a 70° y un ánodo de cobre con una longitud de irradiación de $K\alpha$ de 1.54 Å. Para el análisis de los difractogramas se utilizó el software X'Pert High Score Plus y la base de datos International Centre for Diffraction Data (ICDD).

2.2.3 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia FTIR es una técnica de análisis cualitativo, que permite la identificación de los grupos funcionales de los materiales orgánicos e inorgánicos en estado sólido, líquido y gaseoso (Khan et al., 2018; Dutta, 2017; Gaffney et al., 2012).

El fundamento del FTIR se basa en la medición de la absorción y transmisión de la radiación infrarroja (IR). La muestra se expone a un haz de IR que absorbe frecuencias relacionadas con las energías de enlace vibratorio y rotacional en la molécula del material analizado (Khan et al., 2018; Dutta, 2017). La cantidad de radiación absorbida depende de la concentración y la naturaleza de las moléculas presentes en la muestra (Gaffney et al., 2012). Al medir la cantidad de radiación transmitida y absorbida, se obtiene un espectro infrarrojo que proporciona información de las moléculas orgánicas e inorgánicas (Khan et al., 2018; Dutta, 2017; Gaffney et al., 2012). En resumen, el espectro resultante representa la absorción y transmisión molecular, creando una huella molecular de la muestra (Dutta, 2017).

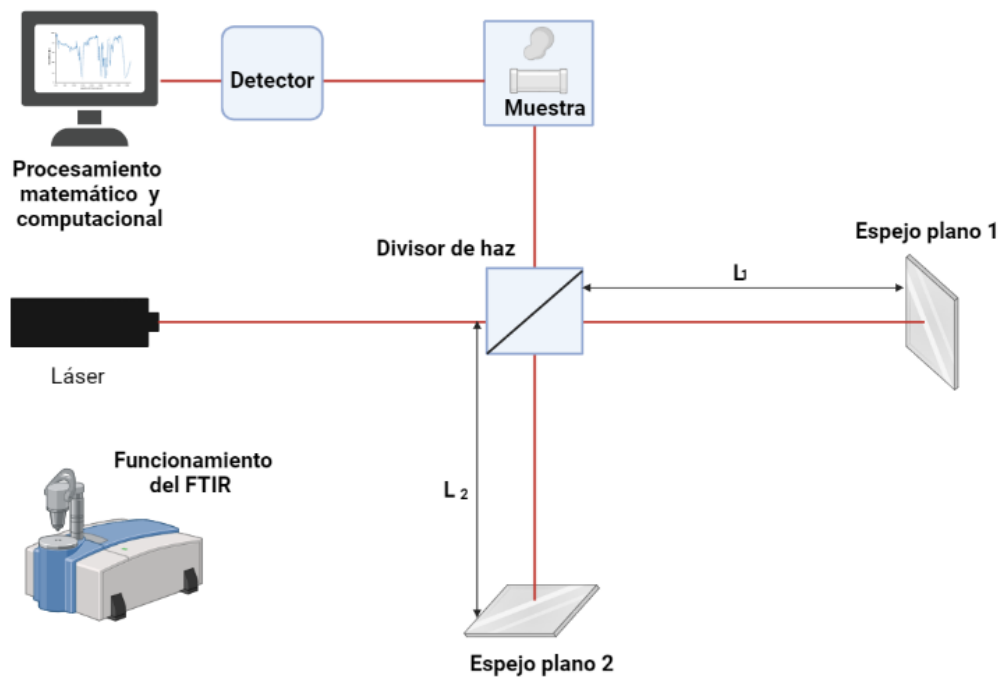


Figura 13. Esquema del funcionamiento de un espectrofotómetro de FTIR. Editado de Stuart, 2005.

Los componentes básicos de un FTIR son: Una fuente de radiación, un interferómetro un detector, una muestra y la computadora (figura 13). La fuente de radiación se encarga de la emisión de radiación del IR que se dirige a la muestra. El interferómetro genera las señales de interferencia que se miden en función

de la diferencia del camino óptico por el detector (Dutta, 2017; Stuart, 2005). Uno de los interferómetros más utilizados es el interferómetro de Michelson, que consta de tres componentes principales: Un espejo móvil, un espejo fijo y un divisor de haz. El detector mide la señal de interferencia generada por el interferómetro después de que la radiación IR ha pasado a través de la muestra y la computadora procesa los datos del detector y realiza la transformada de Fourier para convertir la señal en un espectro de frecuencia (Khan et al., 2018; Dutta, 2017; Stuart, 2005).

Es importante mencionar que, la región del IR se encuentra entre el extremo visible del espectro electromagnético y el extremo de microondas, y abarca longitudes de onda desde aproximadamente 0.1 micrómetros hasta 1000 micrómetros (Khan et al., 2018). En términos de número de onda, la región del infrarrojo se encuentra entre 10000 cm^{-1} hasta 100 cm^{-1} . La región del infrarrojo se divide en tres subregiones: infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio (MIR) e infrarrojo lejano (FIR), las cuales se utilizan para analizar diferentes tipos de muestras y propiedades moleculares (Khan et al., 2018; Dutta, 2017; Gaffney et al., 2012).

La caracterización de las NPs de PVC se realizó con un espectrofotómetro modelo Bruker TENSOR 27. Se analizaron las muestras del tubo de PVC, el PVC envejecido y las NPs de PVC. Los parámetros utilizados para los espectros fueron: Un rango de número de onda entre 4000 cm^{-1} a 340 cm^{-1} . Para su análisis las muestras fueron mezcladas con bromuro de potasio (KBr) de la marca Sigma Aldrich con una pureza de 99.9%, y posteriormente fueron sometidas a un proceso de prensado por 3 minutos a 5 toneladas/cm² de presión para obtener pastillas. Después, los datos fueron graficados en el programa de OriginLab y analizados en el software Bruker Opus 7 y Open Specy.

2.2.4 Espectroscopía de Ultravioleta-Visible

La espectrometría UV-vis es una técnica analítica que se encarga de estudiar el comportamiento de los compuestos químicos en relación con la absorción de luz en la región del espectro Ultravioleta-Visible (Skoog et al., 2001; Malacra, 2004). En la espectroscopía UV-vis los fenómenos de interés son la absorción, transmitancia y reflectancia. La zona del espectro electromagnético (conjunto de todas las longitudes de onda de la radiación electromagnética), se divide en la región de luz visible, la cual comprende las longitudes de onda de 380 a 750 nm, la región del UV cercano con longitud de 190 a 380 nm y la región del UV lejano a una longitud de 100 a 190 nm (Skoog et al., 2008; Bhowmik, 2006).

Para realizar estas medidas se empleó un espectrofotómetro en el que se selecciona la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y mide la cantidad de luz absorbida por la misma (Malacara, 2004). El estudio de la espectroscopía se fundamenta mediante la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones del espectro Ultravioleta y Visible (Skoog et al., 2001; Bhowmik, 2006). Para llevar a cabo la absorción de energía se cuantifica y se obtiene el resultado de la elevación de los electrones (orbitales en el estado básico a orbitales de mayor energía en un estado excitado) (Skoog et al., 2001). Así mismo, las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura molecular y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica) (Bhowmik, 2006).

Para conocer la absorbancia de las NPs de PVC, se realizaron las mediciones en el espectrofotómetro UV-vis (Thermo Fischer Scientific Multiskan Go), Primeramente, se dispersaron 1 μg de NPs de PVC en H_2O Milli-Q mediante ultrasonificación por un lapso de 1 segundo a 220 V, una amplitud del 25%, con intervalos de 9.9 segundos sonicación/descanso y se midió la absorbancia de una suspensión de nanopartículas de PVC de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en H_2O Milli-Q, haciendo un barrido 200 a 450 nm con un paso de 1 nm. Posteriormente, los datos obtenidos se graficaron en el programa OriginLab.

2.2.5 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz (DLS) o espectroscopia de correlación de fotones, es una técnica fisicoquímica que se ha empleado para medir el tamaño hidrodinámico, distribución de tamaños de las partículas en suspensión como las nanopartículas, proteínas y polímeros (Falke y Betzel, 2019; Foord et al., 1970; Mikol et al., 1990). El fundamento del DLS se basa en el análisis del movimiento browniano de las partículas en solución. Cuando se ilumina una muestra de partículas con un láser, la luz dispersada por las partículas fluctúa debido al movimiento aleatorio de las partículas en solución. Estas fluctuaciones se miden y se utilizan para calcular el tamaño hidrodinámico de las partículas también conocido como diámetro hidrodinámico (Falke y Betzel, 2019; Bhattacharjee, 2016). El diámetro hidrodinámico se refiere al tamaño aparente de la partícula en solución hidratada y solvatada (figura 14 A). El coeficiente de difusión se refiere a la velocidad en que las partículas se mueven en una solución debido a la difusión. En el DLS, se miden dos tipos de coeficientes de difusión: El coeficiente de difusión translacional (D_t) y el coeficiente de difusión rotacional (D_r). El D_t es el análisis de las fluctuaciones de la intensidad de la dispersión de las partículas que se mueven en dirección lineal, mientras que el D_r se refiere a la velocidad a la que las partículas giran en solución (figura 14 B) (Bhattacharjee, 2016). Estos coeficientes de difusión se utilizan

para calcular el tamaño hidrodinámico de las partículas mediante la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 1), que nos permite obtener la distribución de tamaños de las NPs en suspensión (Falke y Betzel, 2019; Hassan, 2015; Bhattacharjee, 2016; Edward, 1970).

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

Donde D_h es el diámetro hidrodinámico, k_B es la constante de Boltzmann's, T es la temperatura y η se refiere a la viscosidad del medio (Bhattacharjee, 2016; Edward, 1970).

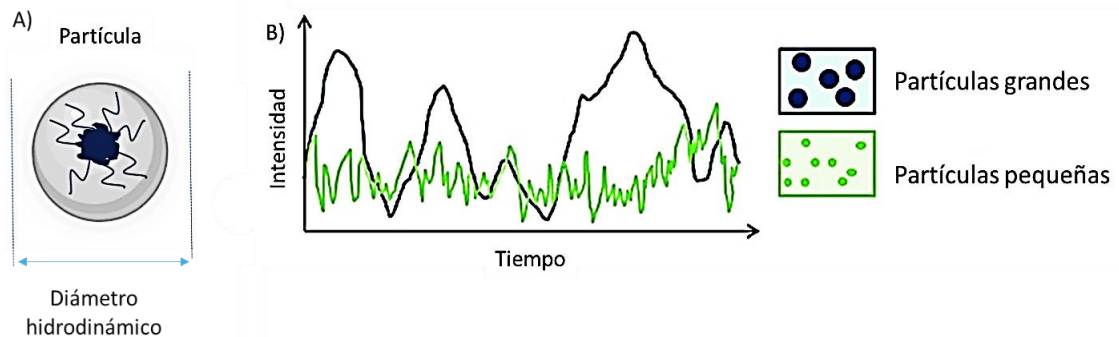


Figura 14. A) Representación del diámetro hidrodinámico de una partícula en suspensión. B) Ilustración de la intensidad de la luz dependiente del tiempo dispersada por partículas, que fluctúan mediante el movimiento browniano. Editado de Falke & Betzel, 2019.

Así mismo, el DLS nos permite obtener el potencial zeta, también conocido como potencial electrocinético, es una medida de la carga eléctrica en la superficie de una partícula en suspensión. El potencial zeta es un parámetro importante en la caracterización de la estabilidad de las dispersiones coloidales, ya que proporciona información sobre las fuerzas repulsivas o atractivas entre las partículas en suspensión (Falke y Betzel, 2019; Hassan, 2015).

Se determinó la distribución de tamaños y el potencial zeta de las NPs de PVC de las concentraciones de 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1 mg/mL en H₂O Milli-Q y los medios empleados en los ensayos de cultivo celular. También se analizó el punto isoeléctrico de las partículas, con la concentración de 1 µg/mL en diferentes disoluciones amortiguadoras a .1 M de ácido clorhídrico (HCl) pH 1 a 3, acetato de sodio (C₂H₃NaO₂) pH 4 a 5 y fosfato de sodio (Na₃PO₄) pH 6 a 8. Una vez dispersas en cada medio, se midió el potencial zeta de cada suspensión en el DLS ZetaSizer NanoZS de la marca Malvern, UK.

2.3 Mantenimiento de la línea celular

Las condiciones de cultivo para la línea celular de los pericitos vasculares del cerebro humano (HBVP-3D) de la marca Science Cell Research fueron: 37 °C, un 5% de CO₂ y una confluencia del 80%. El mantenimiento y el subcultivo, se realizó con el medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de Sigma-Aldrich, se adicionó al medio 10% de suero fetal bovino (SFB Biowest) previamente inactivado a 60°C, 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina y estreptomycin, Sigma-Aldrich) y 1% del suplemento de factor de crecimiento endotelial y para pericitos (Science Cell Research).

Es importante mencionar que, las HBVP-3D se sembraron en una placa recubierta con poli-L-lisina (Sigma Aldrich) a una concentración de 0.1 mg/mL.

2.3.1 Conteo celular

Para cada uno de los ensayos se contaron los HBVP-3D con una cámara de Neubauer o hematocitómetro, el cual es un aparato de vidrio que posee dos superficies reticuladas y dos columnas laterales de una altura de 0.1 mm (Gomes, 2019). El medio de cultivo de la placa de los HBVP-3D se desechó y se le agregó nuevo medio.

Las células fueron removidas con Tripsina (Sigma-Aldrich) incubando por 5 minutos a 37 °C y 5% de CO₂, posteriormente se neutralizó con n+1 mL del medio suplementado y se removieron con un gendarme. Después, se recuperó la suspensión del cultivo y se centrifugó a 1300 rpm por 5 min, el pellet se resuspendió en medio suplementado.

En la cámara se colocó 10 µL del medio de cultivo con las células, el conteo celular se realizó a través de un microscopio óptico. Para ello se contaron las células de cada cuadrante como se muestra en la figura 15, para después obtener un promedio y con la siguiente fórmula (ecuación 2) se obtuvo el número de células por mililitro:

$$\text{Número de células /mL} = \left(\frac{A1 + A2 + A3 + A4}{4} \right) (1000) \quad (2)$$

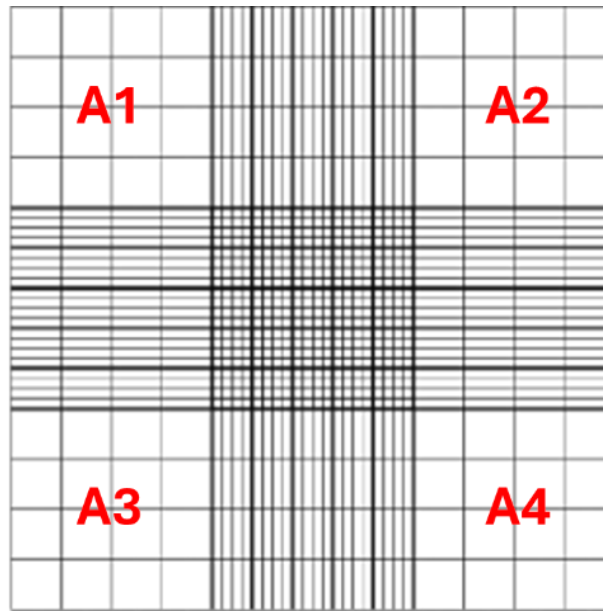


Figura 15. Esquema de la cámara de Neubauer. Elaboración propia en BioRender, 2023.

2.3.3 Viabilidad y proliferación en presencia de las NPs de PVC

La viabilidad celular se define como la proporción de células vivas en una población celular después de la exposición a un agente tóxico o tratamiento experimental. Los ensayos de la viabilidad celular nos brindan información que nos permite identificar la producción de ATP, actividad mitocondrial, actividad enzimática o la integridad de la membrana celular (Kamiloglu et al., 2020; Aslantürk, 2018). Por otro lado, la proliferación celular se refiere al proceso de crecimiento y división celular. La medición de la proliferación celular es importante en muchos campos de investigación, como la biología del cáncer, la toxicología y la farmacología (Kamiloglu et al., 2020). Algunos de los ensayos más comunes utilizados para evaluar la viabilidad y proliferación consisten en ensayos colorimétricos, fluorométricos, luminométricos y citométricos de flujo (Kamiloglu et al., 2020).

2.3.3.1 Ensayos de viabilidad y proliferación celular con MTT

Para determinar la viabilidad y proliferación de la línea celular HBVP-3D en presencia de NPs de PVC, se realizó un ensayo colorimétrico utilizando el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), que se reduce por acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un

compuesto denominado Formazan (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazán)) (Kamiloglu et al., 2020; Boncler et al., 2014; Vistica et al., 1991), ver figura 16.

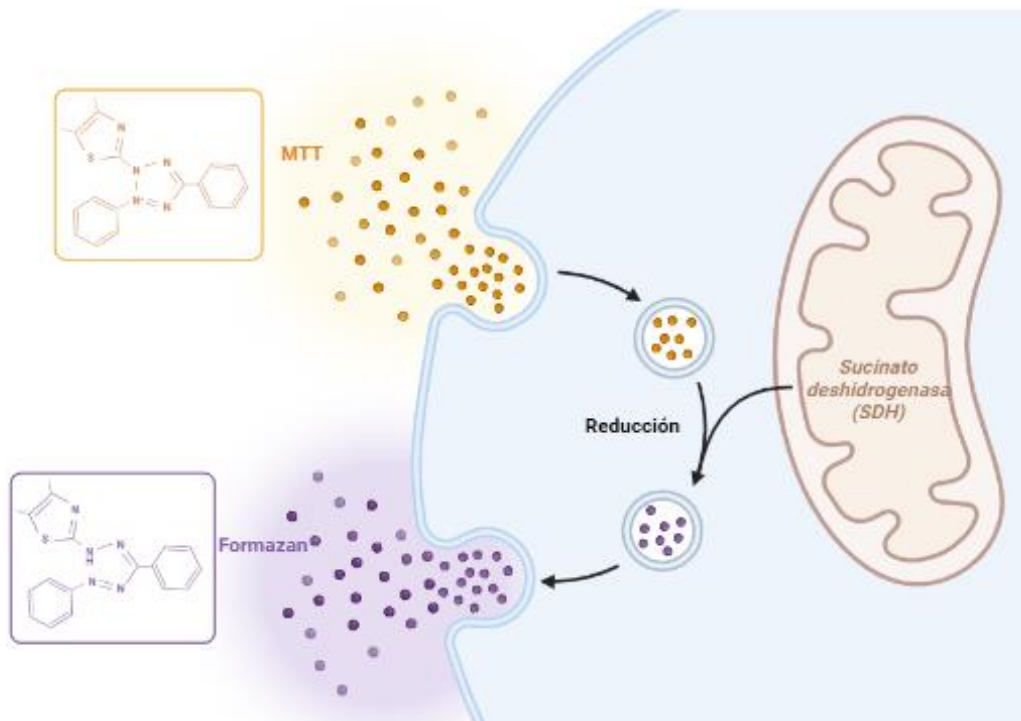


Figura 16. Principio del ensayo de viabilidad celular MTT. Elaboración propia en BioRender, 2023.

El ensayo de viabilidad y proliferación por reducción del MTT, se efectuó en una placa de 96 pozos con 20,000 células por pozo con un volumen final de 100 μ L con DMEM suplementado. Posteriormente, las células se incubaron por 24 horas a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂. Después, a cada pozo, se le agregó por triplicado las concentraciones 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL y 1 mg/mL de las NPs de PVC en un volumen final de 100 μ L por pozo. Para el control negativo se utilizó DMSO al 10% y como control positivo las células sin tratamiento. La placa con las células se incubó por 24, 48 y 72h a 37°C y 5% CO₂. Al finalizar los periodos de incubación, se agregó 10% (v/v) de MTT (5 mg/ml) de la marca Sigma Aldrich y se dejó incubar la placa durante 4h a 37°C y 5% CO₂. Terminado el tiempo de incubación, se adicionó a cada uno de los pozos 100 μ L de una solución del 50% alcohol isopropílico y 50% de ácido acético y se resuspendió para disolver los cristales de Formazán. Después, la placa se incubó por 18 horas a 37°C y 5% CO₂. Finalmente, se midió la absorbancia a longitud de onda de 570 nm y tomando como referencia la medición a 690 nm (Riss et al., 2016) en un espectrofotómetro para microplacas (Thermo Scientific, Multiskan GO). El proceso de la metodología se muestra en la figura 17.

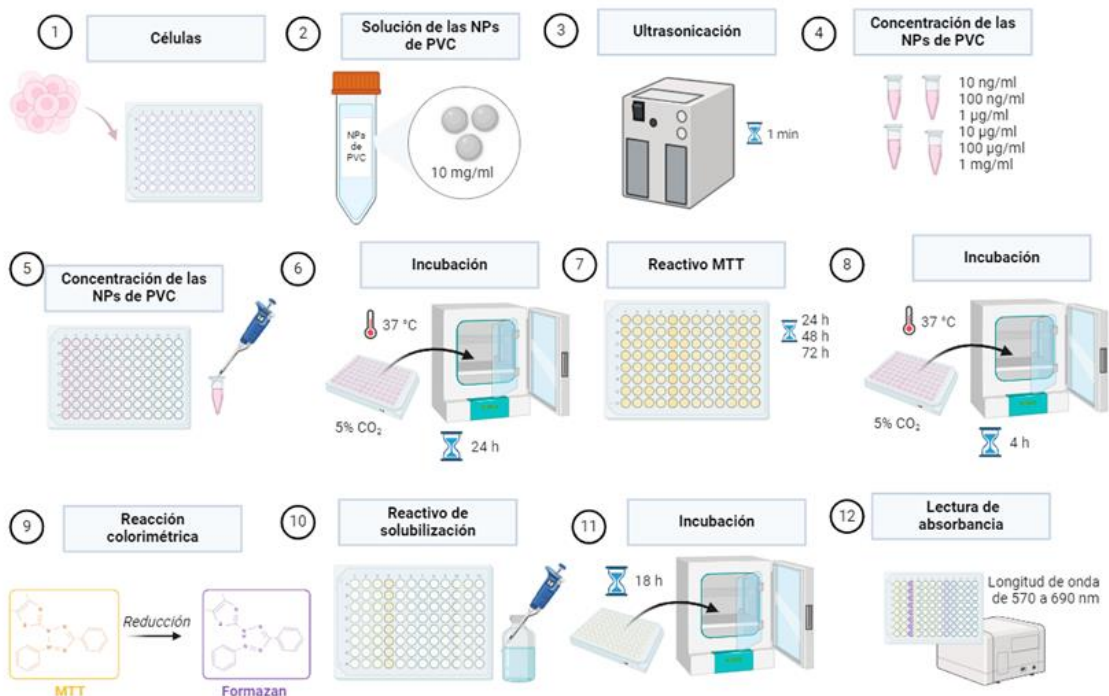


Figura 17. Esquema de la metodología del ensayo de viabilidad y proliferación MTT. Elaboración propia en BioRender 2023.

Para calcular el porcentaje de viabilidad celular, se utilizaron los datos obtenidos de la absorbancia de 570 nm, utilizando la ecuación 3 (Nurlidar, 2016):

$$\text{Viabilidad Celular \%} = \left(\frac{OD \text{ muestra} - OD \text{ medio}}{OD \text{ control} - OD \text{ medio}} \right) (100) \quad (3)$$

2.3.3.2 Ensayos de viabilidad y proliferación celular con Alamar Blue

Para determinar la viabilidad y proliferación de la línea celular HBVP-3D en presencia de NPs de PVC, se realizó con un ensayo colorimétrico utilizando el reactivo Alamar Blue (Sigma-Aldrich), compuesto que se utiliza como indicador de oxidación-reducción en respuesta a la reducción metabólica celular. El Alamar Blue contiene el compuesto de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido), de color azul, que es reducido mediante las células viables a resofurina un compuesto fluorescente en color rosa (Kamiloglu et al., 2020; Aslantürk, 2018), como se muestra en la figura 18.

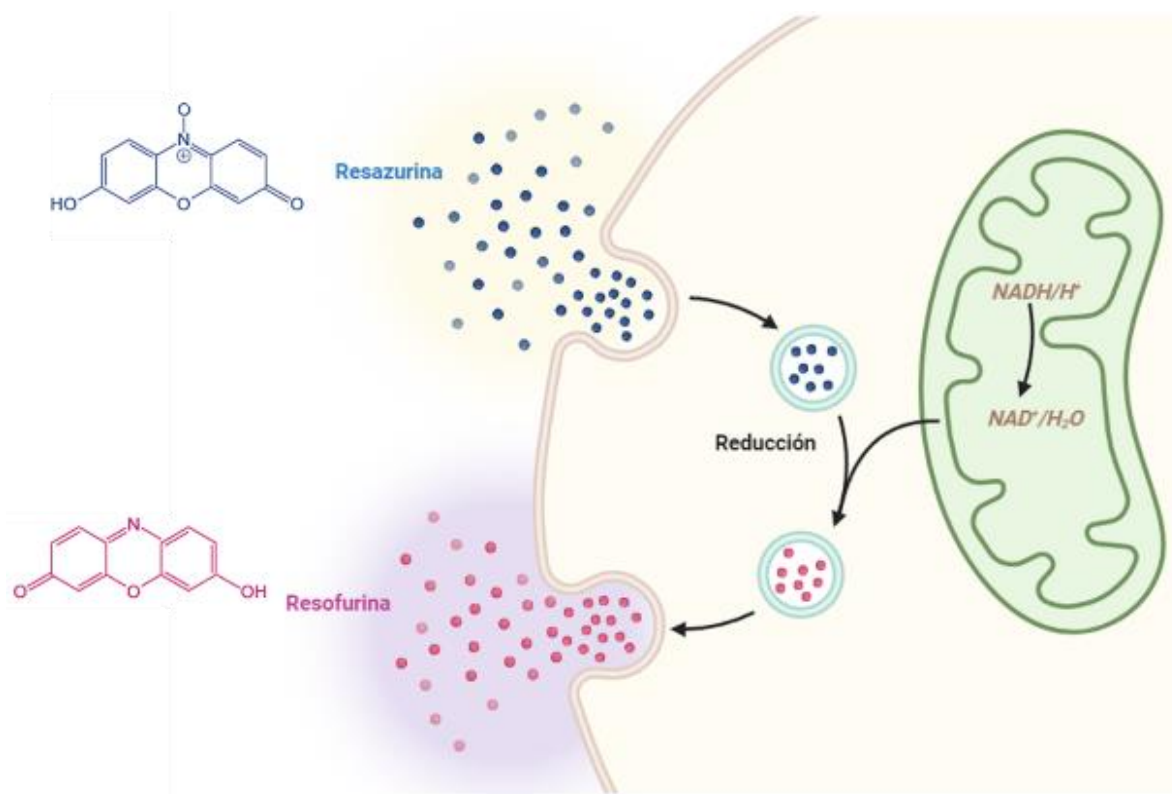


Figura 18. Principio del ensayo de viabilidad celular Alamar Blue. Elaboración propia en BioRender 2023.

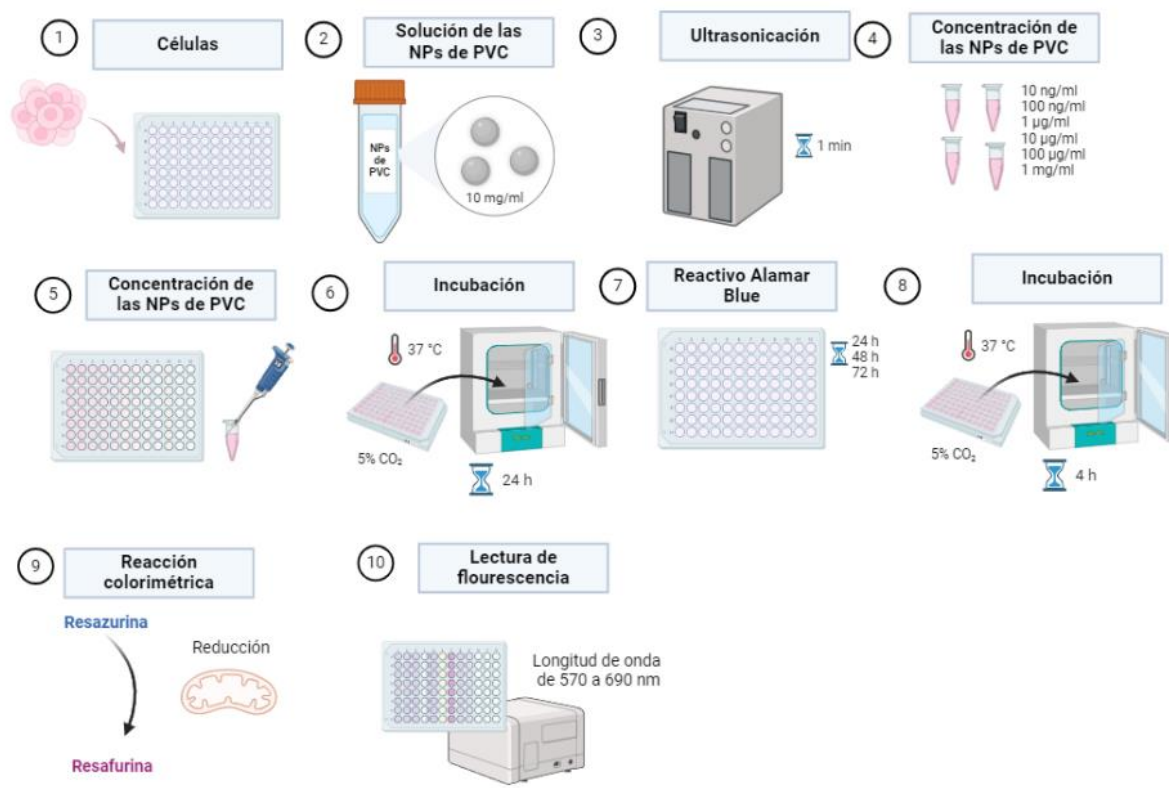


Figura 19. Esquema de la metodología del ensayo de viabilidad y proliferación MTT. Elaboración propia en BioRender, 2023.

El ensayo de viabilidad por reducción de Alamar Blue se realizó en una placa de 96 pozos con 2×10^4 células por pozo llevándolos a un volumen final de 100 μL con medio de cultivo suplementado. Posteriormente, las células se incubaron por 24 horas a 37°C en una atmosfera de 5% de CO_2 . Después, a cada pozo, se le agregó por triplicado las concentraciones 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1 mg/mL de las NPs de PVC en un volumen final de 100 μL por pozo. Para el control negativo se utilizó DMSO al 10% y como control positivo las células sin tratamiento.

Posteriormente, la placa con las células se incubó por 24, 48 y 72h a 37°C y 5% CO_2 . Al finalizar los periodos de incubación, se agregó 10% de Alamar Blue (Sigma- Aldrich) y se incubó por un lapso de 4 horas a 37°C y 5% CO_2 . Finalmente, se midió la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 560 nm y 590 nm (Kamiloglu et al., 2020; Aslantürk, 2018) de emisión mediante un espectrofotómetro de fluorescencia (Agilent modelo Cary Eclipse). El proceso de la metodología se observa en la figura 19.

Para calcular el porcentaje de viabilidad celular, se utilizaron los datos obtenidos de la fluorescencia, ver fórmula (ecuación 4) (Kamiloglu et al., 2020).

$$\text{Viabilidad Celular \%} = \left(\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del control positivo}} \right) (100) \quad (4)$$

2.3.3.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los ensayos de viabilidad y proliferación celular con una $n = 5$, fueron procesados con los softwares Sigma Plot, Sigma Stat y Minitab 19 con los cuales se realizaron análisis de ANOVA de 1 vía y 2 vías, llevando a cabo las pruebas Tukey y T-Student. Las diferencias aceptadas como significativas tuvieron un valor de $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ y se representan con el símbolo *, **, *** respectivamente. Posteriormente, fueron graficados con el programa GraphPad Prism 8.0.2.

2.4 Ensayo de internalización en presencia de las NPs de PVC

2.4.1.1 Ensayo mediante microscopía de fluorescencia

El término de fluorescencia se describe como la emisión de la luz en una molécula por un lapso de

nanosegundos, después de la absorción de luz de mayor energía (Sanderson et al., 2014; Lichtman & Conchello, 2005). El microscopio de fluorescencia es un instrumento que se compone de lámparas de mercurio, xenón o halogenuros metálicos, los cuales se utilizan como fuente de luz para excitar el fluoróforo que contiene las moléculas fluorescentes (Sanderson et al., 2014).

2.4.1.2 Marcaje de las NPs de PVC

El análisis del efecto que generan las NPs de PVC en la línea celular, se realizó mediante microscopía de fluorescencia. Las partículas de PVC se marcaron con el colorante rojo de Nilo (Sigma Aldrich), sustancia fluorescente, que se utilizó para la localización de las NPs de PVC al interactuar con los HBPV-3D. La metodología consistió en un proceso de limpieza de 10 mg de NPs de PVC con etanol absoluto. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL H₂O Milli-Q. Después, se adicionó 40 µL del colorante rojo de Nilo (0.5 mg en 1 mL de DMSO) y las partículas de PVC se incubaron a 30°C durante 18 horas, con agitación constante (200 rpm) y en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó con las mismas condiciones mencionadas y se desechó el sobrenadante. Para eliminar el excedente del colorante se realizaron dos lavados mediante un proceso de resuspensión y centrifugación bajo las mismas condiciones en 1 mL de etanol al 70% y una solución salina tamponada con fosfato al 1X (PBS 1X), desechando el sobrenadante de cada una de las soluciones. Después, se resuspendió en 1 mL de DMEM suplementado, el tubo eppendorf se cubrió con papel aluminio y se ultrasonizó por 6 min.

Para el ensayo se utilizaron 2×10^4 células para cada una de las cajas Petri de 3 cm de diámetro y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ por 18 h. Posteriormente, se agregaron 10 µg/mL de las NPs de PVC marcadas y de las NPs de PVC en el medio DMEM e inmediatamente se incubó a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5% por 0, 24, 48 y 72 h. Es importante mencionar que, se tuvo el grupo control positivo (células sin tratamiento) y el control negativo (células con 10% DMSO). El ensayo fue monitoreado en tiempo real con un microscopio de fluorescencia LS720 Microscope Lumascope (Etaluma Inc., San Diego, CA) que se encuentra acoplado dentro de una incubadora y el software Lumaview 720 en campo claro y fluorescencia (558 emisión y 690 de excitación) con una magnificación 10x. Finalmente, las imágenes obtenidas fueron analizadas y utilizadas para realizar un video de cámara rápida con las imágenes en contraste de fases e imágenes con luz roja fluorescente de cada uno de los ensayos realizados. La metodología se muestra en la figura 20.

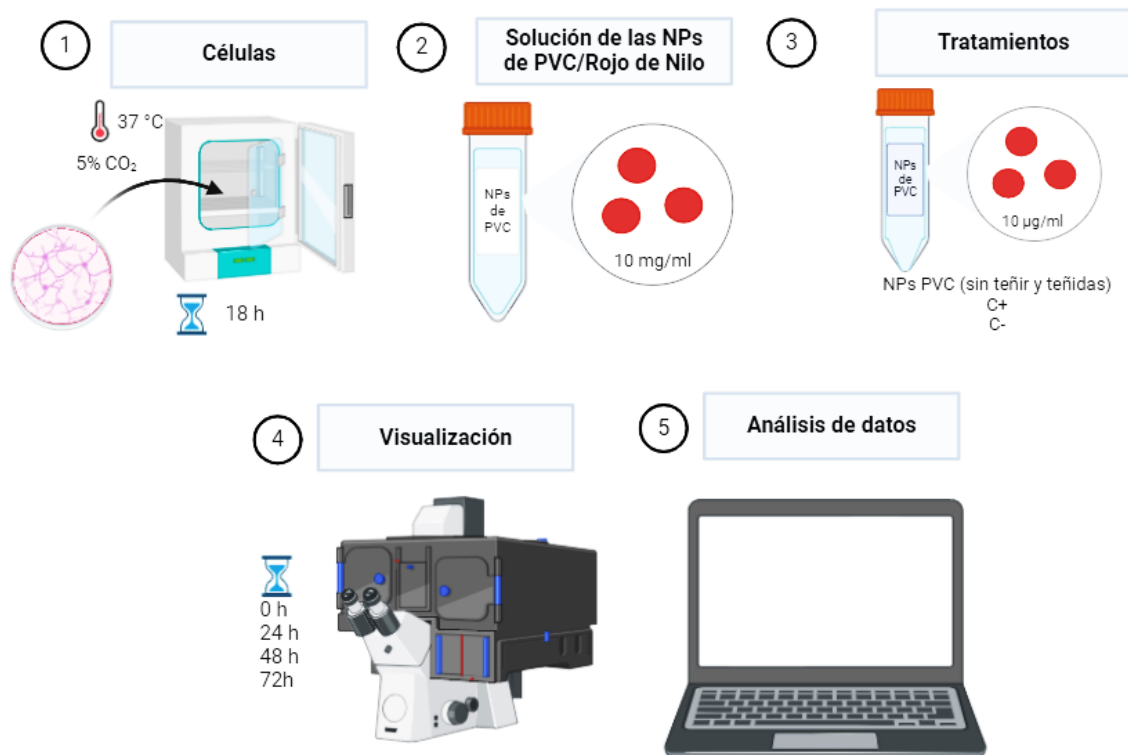


Figura 20. Esquema de la metodología del ensayo de microscopía de fluorescencia. Elaboración propia en BioRender, 2023.

2.4.1.3 Microscopía confocal

La microscopía confocal se ha convertido en una de las técnicas de mayor uso y utilidad en diferentes campos de estudios como biología y biomedicina. Este microscopio permite visualizar el interior y crear imágenes tridimensionales de las células y tejidos (Hibss, 2004). También se utiliza para estudiar la dinámica celular, la migración celular y la interacción entre células y tejidos (Nwaneshiudu et al., 2012, Hibss, 2004).

El confocal es un tipo de microscopio que se compone de varios elementos. Estos elementos incluyen una fuente de luz, un sistema de lentes, un escáner de espejos, un detector de luz y un ordenador para procesar y visualizar las imágenes (Nwaneshiudu et al., 2012). La figura 21 esquematiza los principales componentes que conforman el sistema para microscopía confocal en donde el principio del funcionamiento se basa en el empleo de un láser como fuente de luz. La luz reflejada es recibida por el lente objetivo, el cual permite enfocar el rayo de luz hacia el plano focal de la muestra analizada (López-Macay et al., 2016; Nwaneshiudu et al., 2012). Además, el haz de luz que se encuentra en el interior de la muestra permite que la luz emitida pase a través de orificio y llegue al detector para mejorar la calidad de la imagen (López-Macay et al.,

2016).

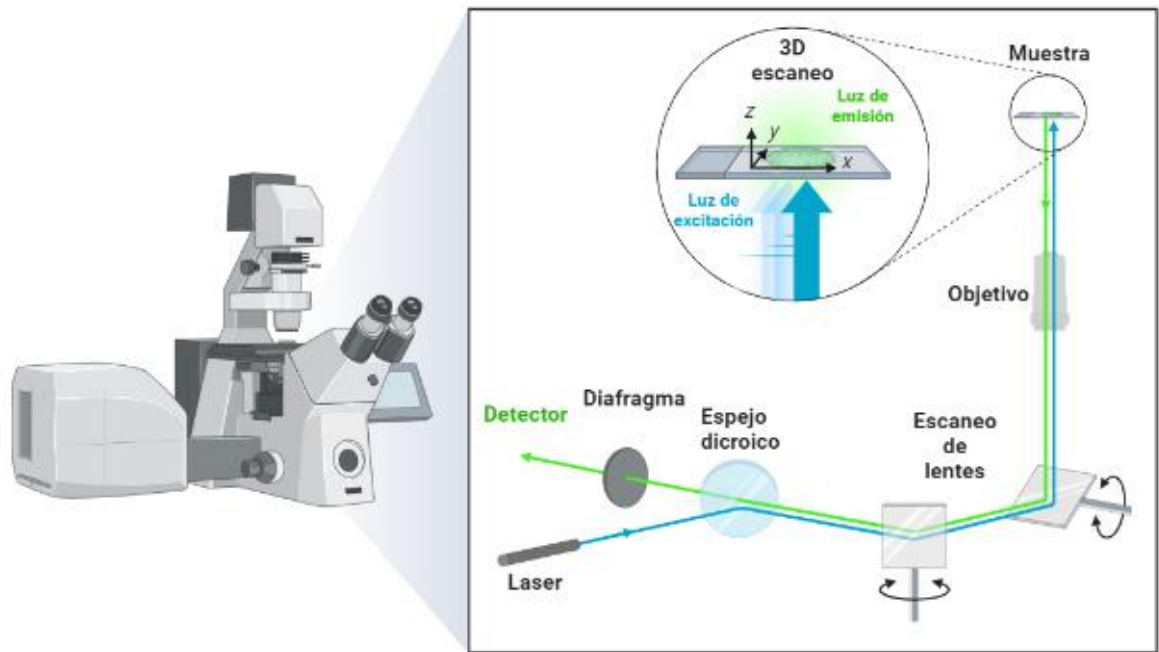


Figura 21. Diagrama esquemático de la estructura un microscopio confocal. Elaboración propia en Biorender, 2023.

La metodología empleada para analizar las HBPV-3D que estuvieron expuestas a las NPs de PVC fue la siguiente: Se limpiaron los cubreobjetos de vidrio con jabón y agua, posteriormente con alcohol al 70% y se esterilizaron en la campana de flujo laminar con luz ultravioleta por 15 min. Los cubreobjetos se colocaron en una caja Petri de 3 cm de diámetro para su funcionalización con 200 μL de poli-L-lisina (Sigma Aldrich) a una concentración de 0.1 mg/mL, que fueron incubados por 18 horas a 37°C en condiciones de esterilidad. Consecutivamente, se retiró el sobrenadante y se dejaron secar los cubreobjetos por un lapso de 10 min.

Luego, se sembraron 2.5×10^4 células en el área del cubreobjetos, se dejaron reposar por 10 min e incubaron por 15 min. Después, se añadió 2 mL de DMEM suplementado y las células fueron incubadas por 18 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Posteriormente, se cambió el medio y se agregaron 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las NPs de PVC marcadas con rojo de Nilo e inmediatamente se incubó a 37°C, en atmosfera de CO_2 al 5% por 24, 48 y 72 h. Pasado el tiempo se prosiguió a fijar las células, retirando el medio de cultivo y adicionando 1.5 ml de metanol (Meyer). Las cajas Petri se cubrió con papel aluminio, se refrigeraron a -20°C por 20 minutos. El metanol se desechó, se agregó 1 mL de PBS 1X y se guardaron nuevamente en refrigeración. Al día

siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y con PBS- Tween 0.3%. Después, se añadieron 120 μL de PBS/Tween 0.3%-BSA 2% y se incubaron 1 h a 37°C.

Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y 3 con PBS-Tween 0.3%. A cada una de las muestras se añadieron 120 μL de una disolución 1:1000 de actina conjugada con el colorante fluorescente de color verde (FITC de Santa Cruz Biotechnology) y se incubaron 1 h a 37°C. Una vez pasado el tiempo de incubación se lavaron 3 veces con PBS 1X y PBS-Tween 0.3%. Para marcar los núcleos se agregaron 120 μL de una disolución 1:10,000 de DAPI, se incubó por 10 min a 37°C. Finalmente, se montaron los cubreobjetos en portaobjetos utilizando glicerol. Todas las muestras se visualizaron en un microscopio confocal FV1000 FluoView (Olympus) con una magnificación de 60x y empleando los parámetros de la excitación y emisión de los marcadores que se visualizan en la figura 22. Las imágenes fueron procesadas con el software FV10-ASW Viewer 4.2 y con Image J.

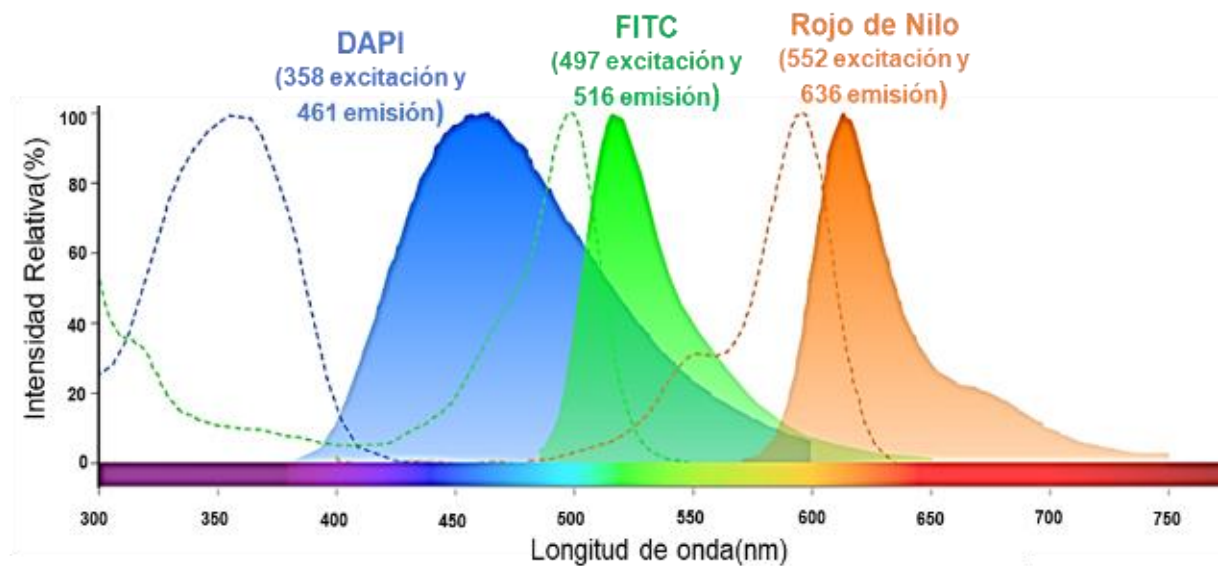


Figura 22. Espectro de excitación y emisión de los fluoróforos utilizados para diferenciar la actina (verde), el núcleo (azul) y las NPs de PVC (naranja). Editado de Thermo Fischer, 2023.

2.4.1.4 Mito-ID Red

Para determinar el daño celular se realizó un ensayo de actividad mitocondrial, con la finalidad de observar si existía un daño parcial o permanente en las mitocondrias de los HBPV-3D. Se siguió la metodología descrita en el apartado 2.4.1.2 Microscopía confocal con las siguientes modificaciones: En la fase de marcaje se preparó la solución con 0.25 μL del MITO-ID (Enzo) en 2.25 μL DMSO, después otra disolución

de 1 mL de PBS 1x con 1 μ L de la disolución previamente preparada y 1 μ L de Hoescht. Agregando 120 μ L de Mito ID Red en cada cubreobjeto y se incubó 30 min a 37°C. Las muestras se fijaron con glutaraldehído, se visualizaron en un microscopio confocal FV1000 FluoView (Olympus) con una magnificación de 60x y empleando los parámetros de la excitación y emisión de los marcadores que se visualizan en la figura 23. Las imágenes fueron procesadas con el software FV10-ASW Viewer 4.2 y con Image J.

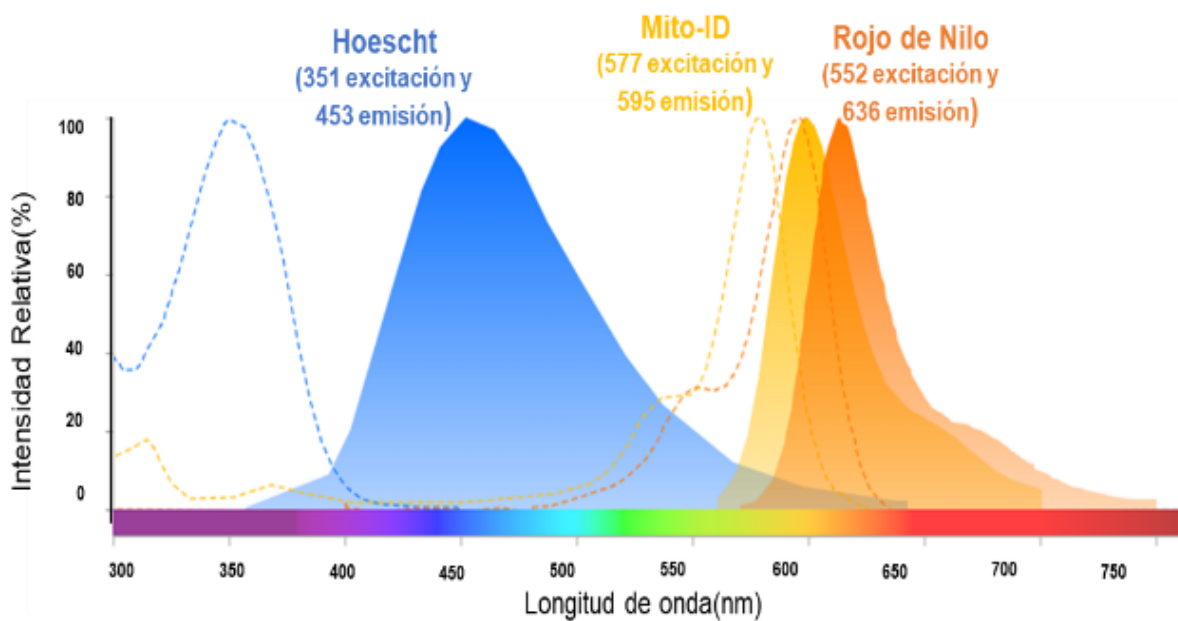


Figura 23. Espectro de excitación y emisión de los fluoróforos utilizados para diferenciar el núcleo (azul), el MITO-ID (amarillo) y las NPs de PVC (naranja). Editado de Thermo Fischer, 2023.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización de las NPs de PVC

3.1.1 Análisis de las NPs de PVC mediante TEM

La micrografía obtenida en el TEM de las NPs de PVC con una magnificación de 70kx y una escala de referencia de 100 nm (figura 24 A); muestra una morfología esferoide y tamaño heterogéneo. Se midieron 200 muestras, obteniendo un tamaño promedio de 152 ± 4.2 nm, con un mínimo de 13 ± 1.8 y un máximo de 278 ± 4.3 nm. En la figura 24 B se observa que la mayor cantidad de las NPs de PVC tenían un tamaño de 100 a 150 nm.

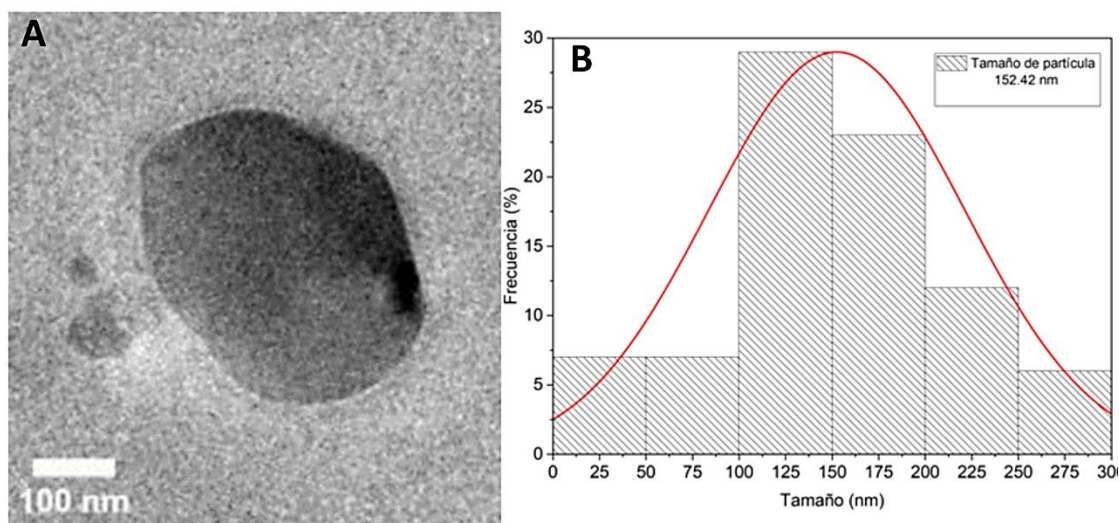


Figura 24. A) Micrografía de las NPs de PVC obtenidas mediante TEM y B) Distribución de los tamaños de las NPs de PVC.

3.1.2 Análisis de NPs de PVC mediante DRX

El espectro de difracción de las NPs de PVC obtenido con el equipo DRX se muestra en la figura 25. En los difractogramas se observan las intensidades de las bandas amorfas y los planos cristalográficos.

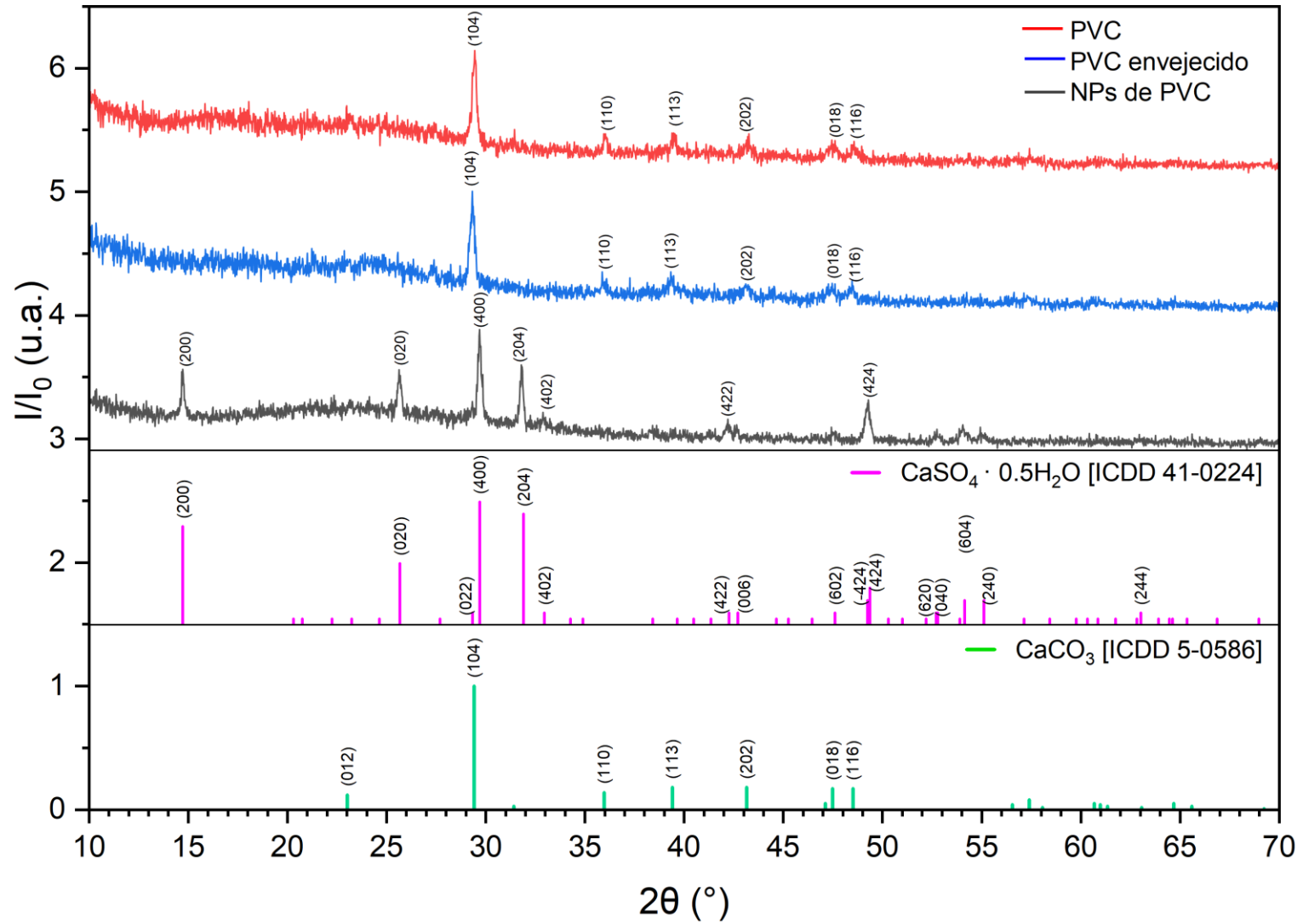


Figura 25. Patrón de difracción del tubo de PVC, PVC envejecido y NPs de PVC.

Es importante destacar que, para el estudio cristalográfico de la viruta del tubo de PVC (difractograma en color rojo), el PVC envejecido (difractograma en color azul) se obtuvo una estructura de carbonato de calcio que es un sistema cristalino romboédrico (código de referencia 00-005-0586), los parámetros cristalográficos se visualizan en la tabla 8 del apartado de Anexos A. Además, las NPs de PVC (difractograma en color negro) es un compuesto de sulfato de calcio hidratado y una estructura cristalina monoclinica (código de referencia 00-041-0224), los planos de reflexión cristalino se muestran en la tabla 9 de Anexos A.

3.3.3 Análisis de NPs de PVC mediante FTIR

Los espectros obtenidos con el equipo de FTIR se ilustran en la figura 26, se observan diferentes bandas características que corresponden a los modos vibracionales de los enlaces químicos del cloruro de vinilo. Las muestras analizadas fueron: El tubo de PVC (espectro en color rojo), el PVC envejecido (espectro en color azul) y las NPs de PVC (espectro en color negro).

En los espectros se muestra la banda de tensión representativa del grupo alquilo del enlace carbono-hidrogeno (C-H) a $2990-2850\text{ cm}^{-1}$, la confirmación del grupo se encuentra en la banda de flexión en $1485-1415\text{ cm}^{-1}$. Una señal de $2960-2900\text{ cm}^{-1}$ que se atribuye a la tensión de la cadena de alquilo con sustitución de halógeno (R-CH₂), corroborándose en la señal de flexión de $705-685\text{ cm}^{-1}$ y $645-610\text{ cm}^{-1}$ (Yaseen et al., 2021; Ramírez et al., 2019; Velandia, 2017; Rubinson et al., 2001).

Además, en las muestras hidratadas, se observa una banda entre $3600\text{ cm}^{-1}-3400\text{ cm}^{-1}$, debido a la presencia de grupos hidroxilos, que se atribuye a la humedad en la muestra (Rubinson et al., 2001; Sammon et al., 1998). Con respecto a las bandas de $2000\text{ a }340\text{ cm}^{-1}$, se identifica la zona de los enlaces de carbono, oxígeno, de los aditivos y estabilizantes del PVC. Se observa una banda del grupo carbonilo del enlace carbono-oxígeno (C=O) en 1797 cm^{-1} en el espectro del tubo de PVC y PVC envejecido, que nos indica la presencia de los compuestos oxidados del carbono (Yaseen et al., 2021; Ramírez et al., 2019).

También en las tres muestras analizadas, se tiene una banda de tensión de carbono-carbono (C-C) a 1250 cm^{-1} , una molécula de carbono-oxígeno (C-O) en $1288\text{ a }1200\text{ cm}^{-1}$, un movimiento de flexión del metileno (CH₂) en $720-730\text{ cm}^{-1}$. La sustitución de los cloros se observa en diferentes longitudes de onda mediante las vibraciones de tensión en $2960-2900\text{ cm}^{-1}$, $1345-1320\text{ cm}^{-1}$ y $1270-1235\text{ cm}^{-1}$ y las bandas se pueden corroborar con la vibración de flexión en $1440-1415\text{ cm}^{-1}$ y $640-600\text{ cm}^{-1}$.

Una señal localizada en $650\text{--}657\text{ cm}^{-1}$ se utiliza para identificar el compuesto carbono-cloro (C-Cl) (Yaseen et al., 2021; Ramírez et al., 2019 Velandia, 2017; Pandey et al., 2016; Rubinson et al., 2001).

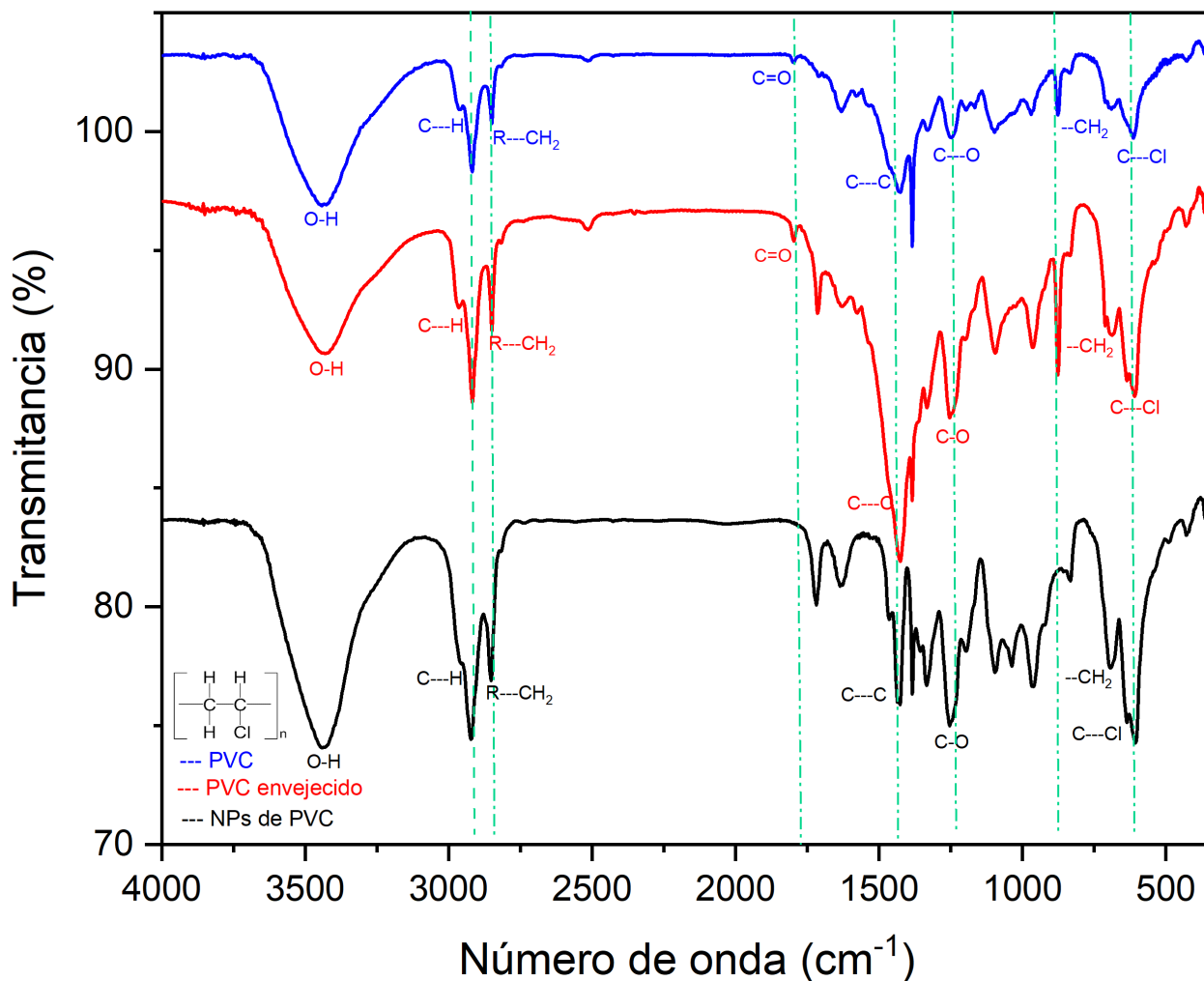


Figura 26. Espectro de transmitancia del FTIR para las muestras del tubo de PVC, PVC envejecido y NPs de PVC.

3.3.4 Análisis de NPs de PVC mediante espectroscopia de UV-Vis

En la figura 27 se presenta el espectro obtenido de la NPs de PVC a una concentración de $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ en H_2O Milli-Q. Se muestra una banda de absorción en los 206 nm , que con respecto a lo reportado se atribuye a la presencia del PVC (Monika et al, 2015). Además, se observa una banda tipo hombro que comienza en 225 nm y decrece hasta llegar a 248 nm .

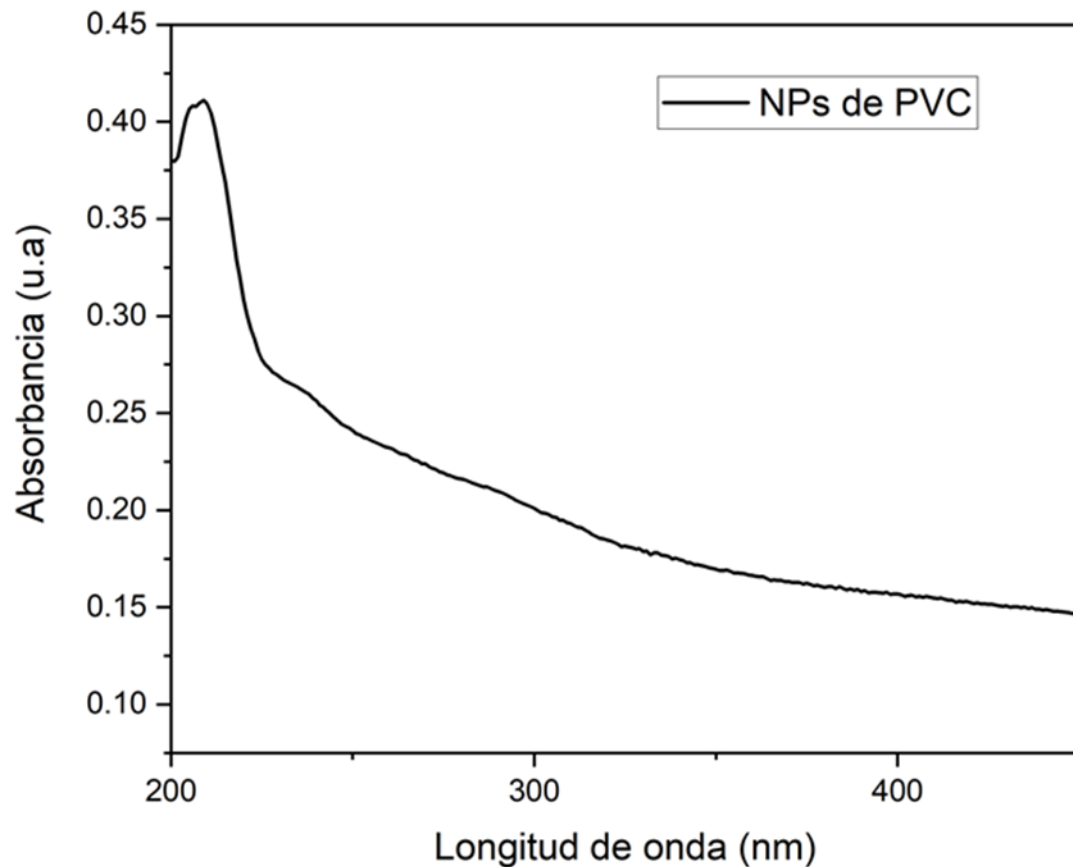


Figura 27. Espectro de UV-Vis de las NPs de PVC.

3.3.5 Análisis de NPs de PVC mediante DLS

3.3.5.1 Distribución de tamaños y potencial zeta

Se realizaron 3 mediciones por muestra para obtener la distribución del tamaño y el potencial zeta de las NPs de PVC a las concentraciones de 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1 mg/mL. La figura 36 que se encuentra en el apartado de anexos B, muestran la distribución de los tamaños, el cual se representa como diámetro hidrodinámico (d.nm) de las nanopartículas de PVC en agua desionizada. Así mismo, en las figuras 37 y 38 (A y B) del apartado de anexos se observa la distribución de tamaños en el medio DMEM y DMEM suplementado con sus respectivos factores de crecimiento. Para visualizar detalladamente los promedios de los tamaños y el potencial zeta, se representan en la tabla 4.

En la tabla 4 se muestra que el tamaño promedio de las NPs de PVC aumenta con respecto a la concentración analizada. Sin embargo, a menor concentración las partículas se encuentran más dispersas

en los diferentes medios que se analizaron.

También, se muestra en la tabla 4 el promedio del potencial zeta, que nos indica la carga superficial de las nanopartículas de PVC al interactuar con los medios de agua ultrapura como el DMEM y DMEM suplementado. En el caso del H₂O Milli-Q se puede observar un incremento en el valor del potencial Z en comparación con el DMEM y DMEM suplementado, ya que en estos últimos el potencial zeta neto oscilo entre -9 mV a -12 mV.

Tabla 4. Resultados de las mediciones del equipo DLS, se muestra el promedio del tamaño (diámetro hidrodinámico) y potencial zeta de los medios empleados como el agua, el DMEM y DMEM suplementado (10% SFB, 1% antibiótico-antimicótico y 1% del suplemento de los factores de crecimiento endotelial y de pericitos). Los datos obtenidos se reportan como valores promedio \pm desviación estándar (n=3).

Medios	H ₂ O Milli-Q		DMEM		DMEM suplementado	
	Tamaño (d.nm)	Potencial Z (mV)	Tamaño (d.nm)	Potencial Z (mV)	Tamaño (d.nm)	Potencial Z (mV)
10 ng/mL	207.9 \pm 2.2	-25.0 \pm 5.0	20.5 \pm 0.6	-9.9 \pm 0.4	20.6 \pm 0.6	-12.0 \pm 0.6
100 ng/mL	218.1 \pm 7.8	-23.8 \pm 2.5	25.9 \pm 3.5	-10 \pm 0.5	27.6 \pm 0.7	-11.7 \pm 0.2
1 μ g/mL	241.7 \pm 0.8	-27.9 \pm 1.9	98.3 \pm 1.9	-10.9 \pm 0.5	108 \pm 1.2	-11.5 \pm 0.7
10 μ g/mL	376.9 \pm 10.3	-22.5 \pm 2.9	105.7 \pm 17.1	-10.8 \pm 1.1	144.4 \pm 11.3	-8.6 \pm 0.7
100 μ g/mL	417.5 \pm 13.7	-25.8 \pm 4.3	216.8 \pm 4.3	-11.2 \pm 0.4	139.4 \pm 0.9	-10.4 \pm 0.4
1 mg/mL	421.3 \pm 16.8	-21.6 \pm 2.6	270.4 \pm 13.5	-11.9 \pm 0.9	363 \pm 17.4	-12.2 \pm 0.7

3.3.5.2 Punto isoeléctrico de las NPs de PVC

Los resultados de potencial zeta en diferentes soluciones amortiguadoras se presenta en la figura 28. Podemos observar que el pH en el cual la carga total neta es igual a 0 de las nanopartículas, se da a un pH de 1.41.

Por otro lado, en la tabla 5 se muestran tanto del promedio del potencial zeta obtenido como del promedio de diámetro hidrodinámico en las diferentes soluciones amortiguadoras. Los resultados muestran que las NPs de PVC se aglomeran en las soluciones amortiguadoras ácidas (pH 1 a 3), con diámetros hidrodinámicos cercanos a 1 micrómetro. En el caso de las soluciones amortiguadoras de fosfatos (pH 4 y 5) y acetatos (pH 6 a 8) las NPs de PVC disminuyen su diámetro hidrodinámico.

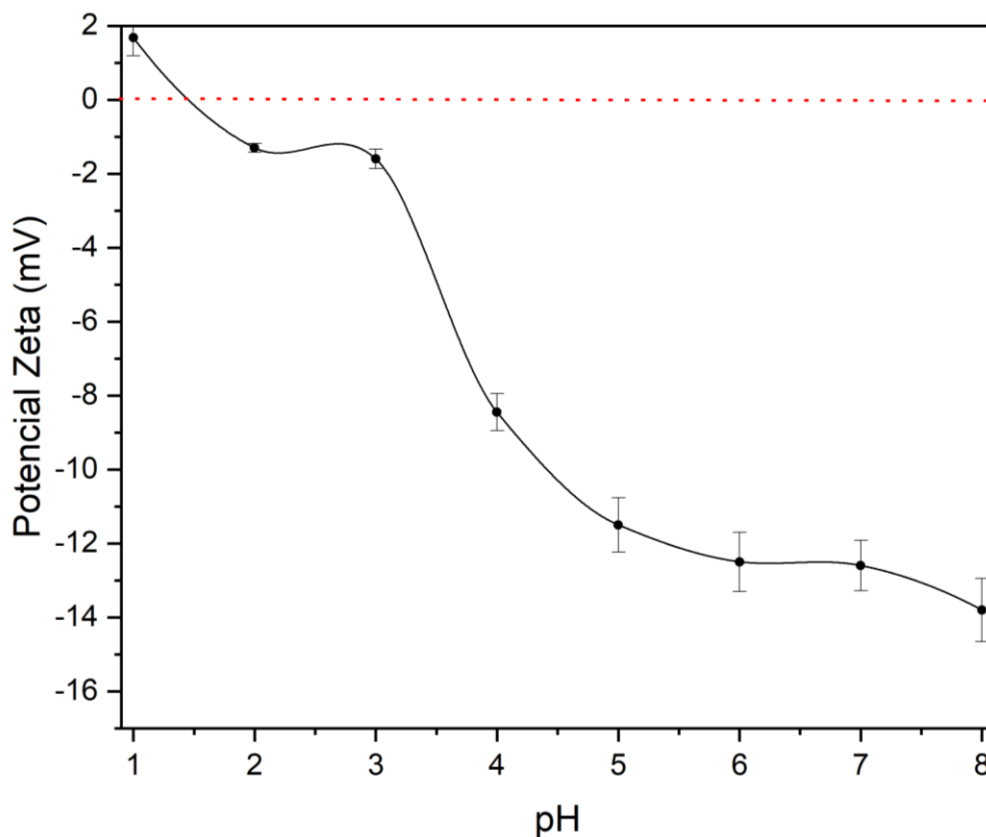


Figura 28 . Punto isoeléctrico de las nanopartículas de PVC resuspendidas en diferentes soluciones de pH.

Tabla 5. Resultados de las mediciones del equipo DLS, se muestra el promedio del tamaño (diámetro hidrodinámico) y potencial zeta de las disoluciones amortiguadoras a diferentes pH. Los datos obtenidos se reportan como valores promedio \pm SD (n=3).

Disoluciones amortiguadoras	Potencial Z (mV)	Tamaño (d.nm)
HCl (pH 1)	1.68 \pm 0.4	968.6 \pm 3.1
HCl (pH 2)	-1.3 \pm 0.1	945.1 \pm 5.6
HCl (pH 3)	-1.6 \pm 0.2	843.4 \pm 3.9
C ₂ H ₃ NaO ₂ (pH 4)	-8.45 \pm 0.5	741.3 \pm 3.6
C ₂ H ₃ NaO ₂ (pH 5)	-11.5 \pm 0.7	588.6 \pm 8.3
Na ₃ PO ₄ (pH6)	-12.5 \pm 0.8	447.9 \pm 1.6
Na ₃ PO ₄ (pH7)	-12.6 \pm 0.6	376.9 \pm 3.9
Na ₃ PO ₄ (pH8)	-13.8 \pm 0.8	330 \pm 8.09

3.3.6 Evaluación de la toxicidad de las NPs de PVC

3.3.6.1 Viabilidad y proliferación celular de los HBPV-3D con las NPs de PVC

3.3.6.1.1 Ensayo MTT

En la figura 29 se representan los resultados obtenidos en el ensayo de MTT con la línea celular HBPV-3D a 24, 48 y 72h con las diferentes concentraciones de las NPs de PVC. Los datos fueron graficados, representando el porcentaje de la viabilidad celular de las concentraciones de las NPs de PVC, sus controles negativos (C-) y positivo (C+). Es importante mencionar, que los valores fueron normalizados con respecto al C+, siendo este el 100 % de viabilidad.

También, en la figura 29 se puede observar conforme transcurre el tiempo de 24, 48 Y 72h un decremento en la viabilidad celular para los tratamientos analizados (10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1 mg/mL) al ser comparado con el C+. De manera general, se visualiza que existe un efecto citotóxico en las diferentes concentraciones de las NPs de PVC.

Además, en la tabla 6 se observa el promedio del porcentaje de la viabilidad celular dependiente de la concentración de las NPs PVC, se muestra que las concentraciones 10 ng/mL y 100 ng/mL tiene una mayor toxicidad a las 72 h. Sin embargo, los tratamientos de 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL se visualiza un decremento de las 24h a 48 h y un aumento a las 72 h del porcentaje de viabilidad celular.

Tabla 6. Resultados de las mediciones del ensayo MTT, se muestra el promedio del porcentaje de viabilidad celular para cada una de las concentraciones de las NPs de PVC. Los datos obtenidos se reportan como valores promedio (n=3).

Porcentaje de viabilidad celular (%)			
Concentraciones	24h	48h	72h
10 ng/mL	~65	~34	~8
100 ng/mL	~62	~17	~8
1 µg/mL	~59	~13	~18
10 µg/mL	~48	~13	~20
100 µg/ml	~53	~15	~20
1 mg/ml	~95	~70	~15

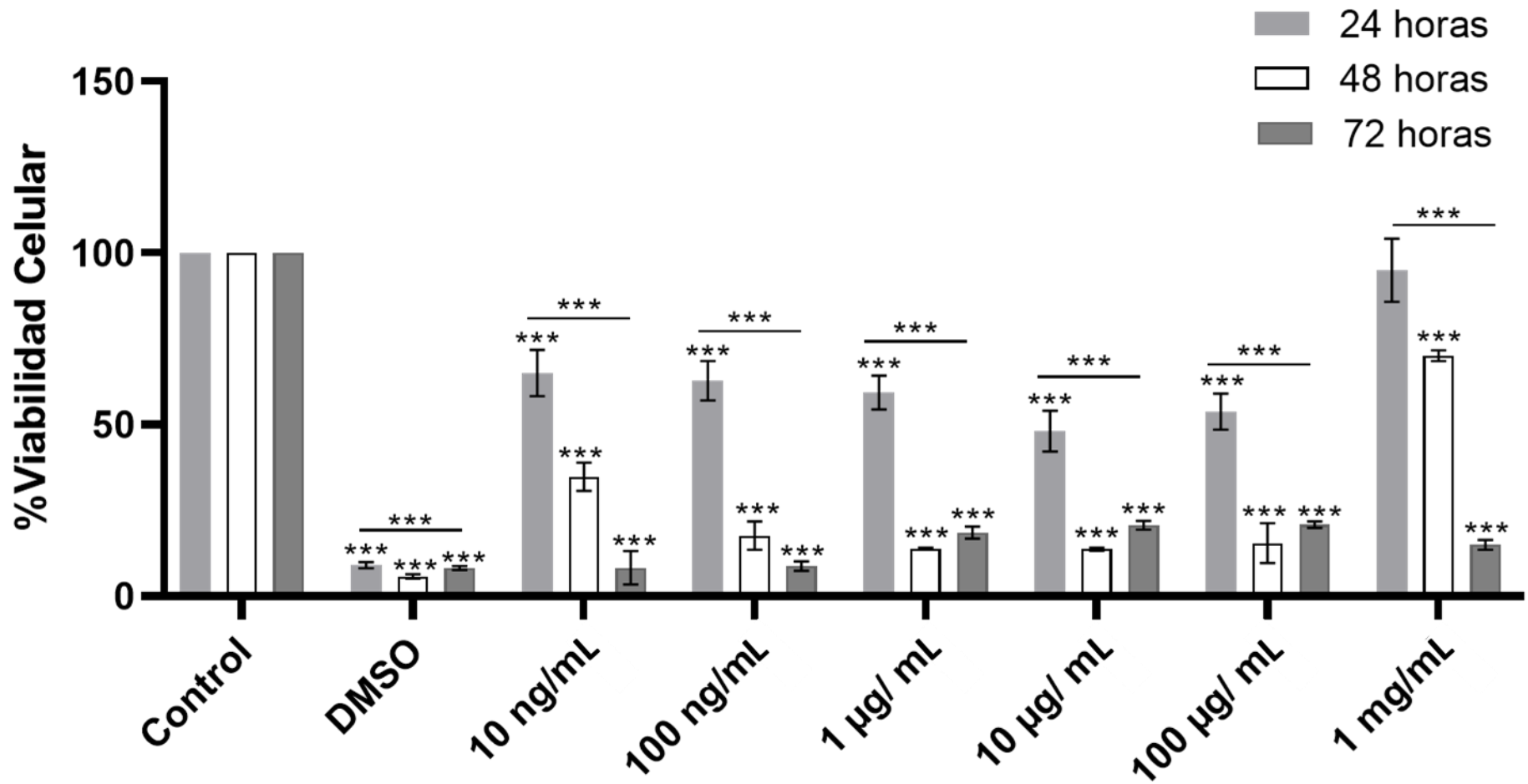


Figura 29. Viabilidad celular de las HBPV-3D en presencia de diferentes concentraciones de las NPs de PVC para el ensayo de MTT. La información tiene una desviación estándar promedio SD (n=3). El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de 2 vías de las pruebas Tukey y T-Student en donde * P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001.

En la figura 29 se representa el análisis de varianza multifactorial (ANOVA de 2 vías) de las pruebas Tukey y T-Student, con un $R^2=0.95$ y una $P < 0.050$, este análisis estadístico indicó que los valores al ser comparados con el C+ con respecto a las concentraciones de las NPs de PVC, el grupo C- y el tiempo transcurrido, presentaron diferencias significativas de ($P < 0.001$). Además, la concentración de 1 mg/ml a 24 h no presentó ninguna diferencia significativa. De manera general, se puede observar que las concentraciones de 10 ng/mL, 100 ng/mL y 1 mg/mL se caracterizan por un decremento de viabilidad celular en el tiempo de 24 a 72h. Con respecto a las muestras de 1 µg/mL, 10 µg/mL y 100 µg/mL se visualizó un decremento de 24 a 48 h y un incremento a las 72 h del porcentaje de viabilidad celular, lo cual se atribuye al efecto que generan las NPs de PVC en los HBPV-3D.

3.3.6.1.2 Ensayo Alamar Blue

La figura 30 representan los datos obtenidos en el ensayo de Alamar Blue en la línea celular HBPV-3D a 24, 48, 72 h con las concentraciones de NPs de PVC (10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL y 1 mg/mL). Los datos fueron graficados, representando el porcentaje de la viabilidad celular para las diferentes concentraciones de las NPs de PVC, los grupos controles (C+ y C-). Es importante mencionar que, los valores fueron normalizado con respecto al (C+), considerando este como el 100 %.

Tabla 7. Resultados de las mediciones del ensayo Alamar Blue, se muestra el promedio del porcentaje de viabilidad celular para cada una de las concentraciones de las NPs de PVC. Los datos obtenidos se reportan como valores promedio (n=3).

Porcentaje de viabilidad celular (%)			
Concentraciones	24h	48h	72h
10 ng/mL	~104	~136	~88
100 ng/mL	~117	~137	~87
1 µg/mL	~87	~114	~109
10 µg/mL	~82	~212	~146
100 µg/mL	~154	~49	~113
1 mg/mL	~95	~76	~104

Además, en la tabla 7 se observa el promedio del porcentaje de la viabilidad celular dependiente de la

concentración de las NPs PVC, se muestra que las concentraciones 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL y 10 µg/mL aumenta el porcentaje de viabilidad celular de 24 a 48h y un decremento a 72h. Por otro lado, las muestra de 100 µg/mL y 1 mg/mL disminuye el porcentaje de viabilidad celular de 24 a 48h y un aumento a 72h.

En la figura 30 se puede observar los efectos ocasionados en la viabilidad de los HBPV-3D, ya que a las 24 h las concentraciones de las NPs de PVC 10 ng/mL, 100 ng/mL y 100 µg/mL muestran un incremento en los valores promedio del porcentaje de reducción del alamar blue lo que parece ser un aumento en el porcentaje de viabilidad celular. Al mismo tiempo, las concentraciones 1 µg/mL, 10 µg/mL y 1 mg/mL disminuyeron su porcentaje de reducción de la resazurina.

Por otro lado, a las 48 h se observa que las concentraciones de 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL incrementan el porcentaje de reducción de la resazurina, al mismo tiempo la concentración que muestra tener mayor viabilidad celular es 100 µg/mL respecto a C+. Sin embargo, las concentraciones de 100 µg/mL y 1 mg/mL tienen un efecto contrario, ya que parece que hubo una disminución de la viabilidad celular. Con respecto a las 72 h, se observa que solo la concentración de 10 µg/mL mantuvo el incremento en la viabilidad celular, al ser comparado con el C+, mientras que las concentraciones de 1 µg/mL, 100 µg/mL y 1 mg/mL mantuvieron valores de viabilidad cercanos al control positivo. Finalmente, se observó que las concentraciones de 10 ng/mL y 100 ng/mL se presenta un efecto de disminución en su viabilidad.

Es importante mencionar que, la figura 30 se analizó mediante la varianza multifactorial (ANOVA de 2 vías) de las pruebas Tukey y T-Student, con una $R^2=0.95$ y una $P=0.423$. Al ser comparado con el C+, en este análisis se obtuvo que a las 48 h la concentración de 10 ng/mL cuenta con una diferencia significativa de ($P<0.001$). La concentración de 100 ng/mL mostró diferencias significativas ($P<0.01$) a 24 h, ($P<0.001$) en 48 h y ($P<0.05$) a 72 h. Para la concentración de 1 µg/mL las diferencias significativas fueron de ($P<0.05$) y ($P<0.01$) para 24 y 48 h respectivamente.

Se observó una diferencia significativa de ($P<0.001$) para la concentración de 10 µg/mL. La concentración de 100 µg/mL tuvo una ($P<0.001$) en 24 y 48 h, sin embargo, a 72 h la diferencia significativa fue de ($P<0.05$). Finalmente, la concentración de 1 mg/mL presento una diferencia significativa de ($P<0.001$) a las 48 h.

Con los resultados obtenidos de la viabilidad y proliferación con ambas técnicas, los ensayos de internalización se realizaron con la concentración de 10 µg/mL.

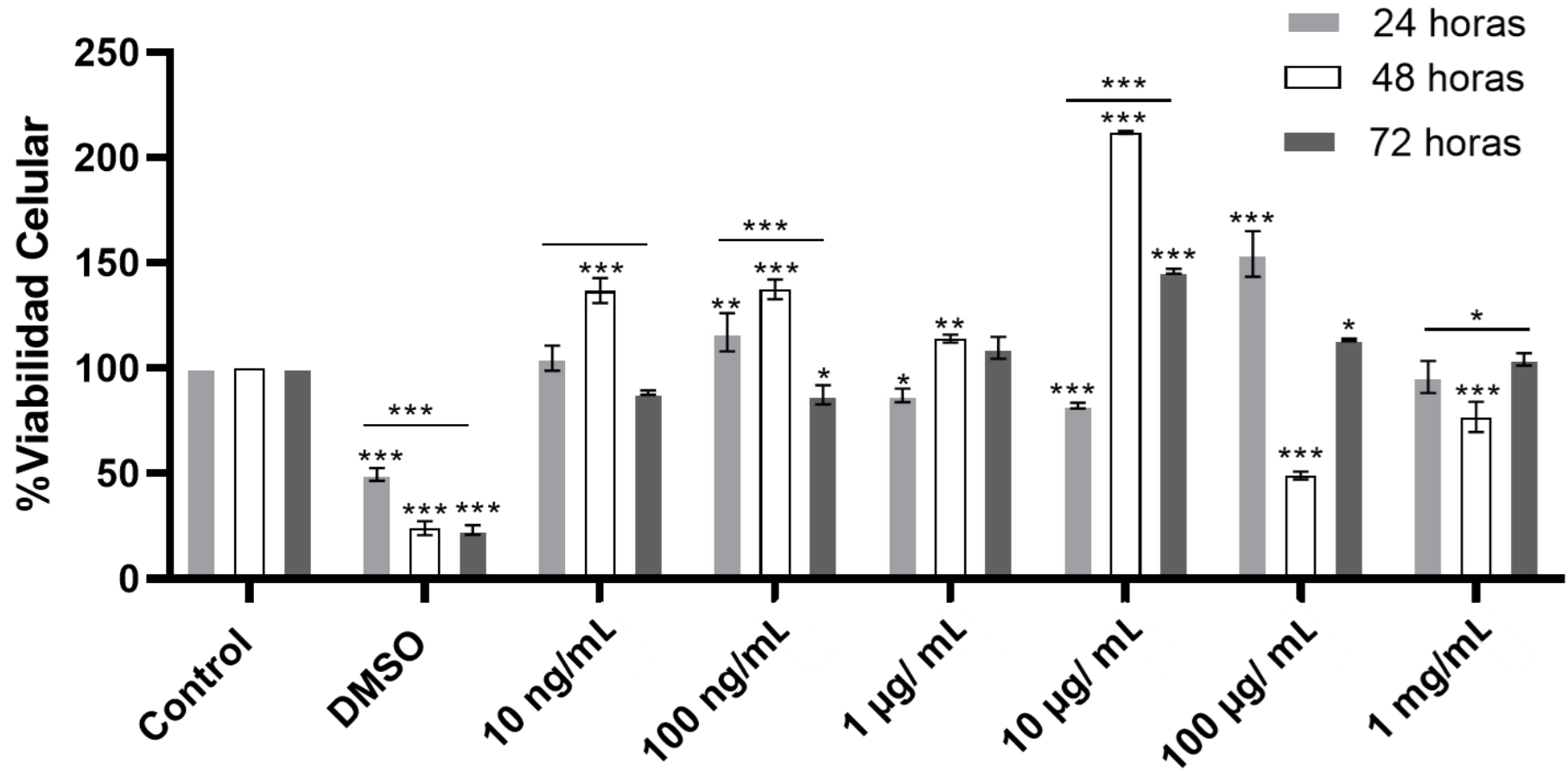


Figura 30. Viabilidad celular de las HBPV-3D en presencia de diferentes concentraciones de las NPs de PVC para el ensayo de Alamar Blue. La información tiene una desviación estándar promedio SD (n=3). El análisis estadístico fue realizado fue ANOVA de 2 vías de las pruebas Tukey y T-Student en donde * P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001.

3.3.7 Ensayos de internalización de las NPs de PVC en los HBPV-3D

3.3.7.1 Microscopía de fluorescencia

En la figura 31 (1 y 2) se observan los cambios de los HBPV-3D durante las 0, 24, 48 y 72 h. Las imágenes presentan los resultados obtenidos con las células control o células sin tratamiento (C+), las células incubadas con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las NPs de PVC (marcadas con rojo de Nilo) y células en presencia de DMSO al 10% (C-).

En las imágenes A, E, I y M (células sin estímulo) se muestra un incremento en los HBPV-3D lo que indica la proliferación de estas células durante todo el ensayo de un lapso de 72h. Con respecto a las columnas de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las NPs de PVC tanto en contraste de fases de las micrografías identificadas con las letras (B, F, J y N) y las de fluorescencia en rojo (C, G, K y O), las células se observan rodeadas por las partículas que en algunos casos se encuentran aglomeradas. Para la identificación de las NPs de PVC aglomeradas se utilizó una figura de hexágono en las imágenes de contraste de fase y círculo en las imágenes de fluorescencia.

Cabe destacar que, las imágenes de fluorescencia (31 C, G, K y O) permitieron identificar el tamaño de los aglomerados de NPs de PVC, donde los recuadros de color blanco (hexágono y círculo) enmarcan un aglomerado con un tamaño de $99\pm 6.6 \mu\text{m}$, mientras que en los recuadros de color morado las partículas mostraron dimensiones de $23\pm 5.4 \mu\text{m}$, en los recuadros verdes las dimensiones fueron de $46\pm 5.6 \mu\text{m}$ y finalmente en color azul las dimensiones fueron de $57\pm 5.0 \mu\text{m}$.

Por otro lado, se puede apreciar en las micrografías identificadas con las letras (B, F, J y N) que los HBPV-3D no mueren durante todo el ensayo, pero si quedo evidenciado que las nanopartículas tuvieron un efecto en su proliferación, ya que el número de células no incrementó a la misma velocidad que en las células control en las 48 y 72 h.

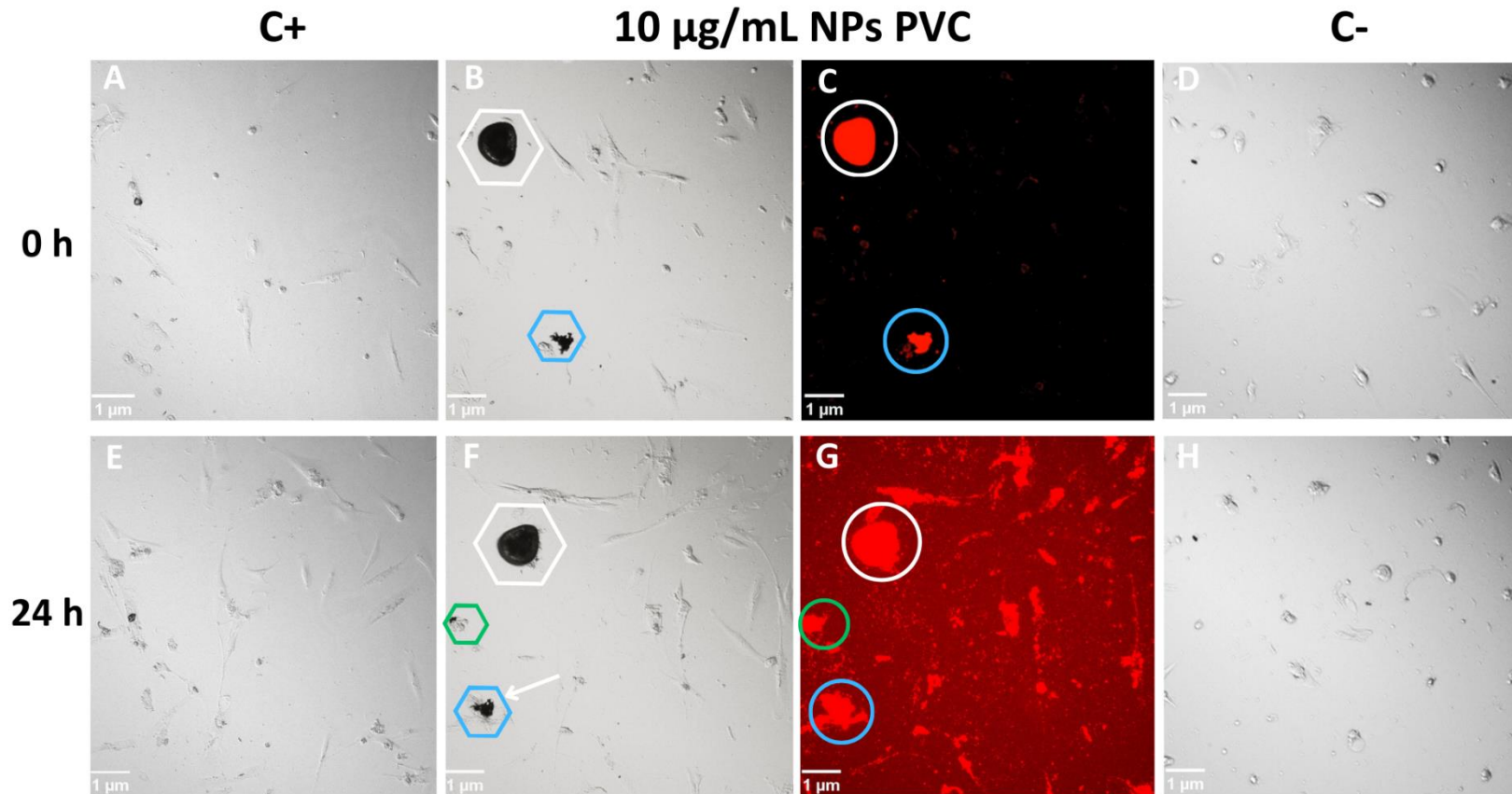


Figura 31-1. Micrografías obtenidas mediante microscopía de fluorescencia a 10x. Se muestran los cambios que experimentan los HBPV-3D durante las 0 y 24 h, con NPs de PVC a una concentración de 10 µg/mL. Todas las imágenes presentan una escala de 1 µm. Las imágenes A y E, representan al C+, las micrografías B y F son el tratamiento de las NPs de PVC, C y G, denotan las NPs de PVC marcadas con rojo de Nilo, mientras que la D y H, muestran el C-. Es importante mencionar que, la figura del hexágono (blanco, azul y verde) indica los aglomerados de las NPs de PVC (B y F). La flecha indica que los HBPV-3D se acercan a los aglomerados del PVC, sin embargo, los círculos (blanco, azul y verde) indican que se trata de aglomeraciones de NPs de PVC marcadas con rojo de Nilo y los hexágonos (blanco, azul y verde) hace referencia a las NPs de PVC.

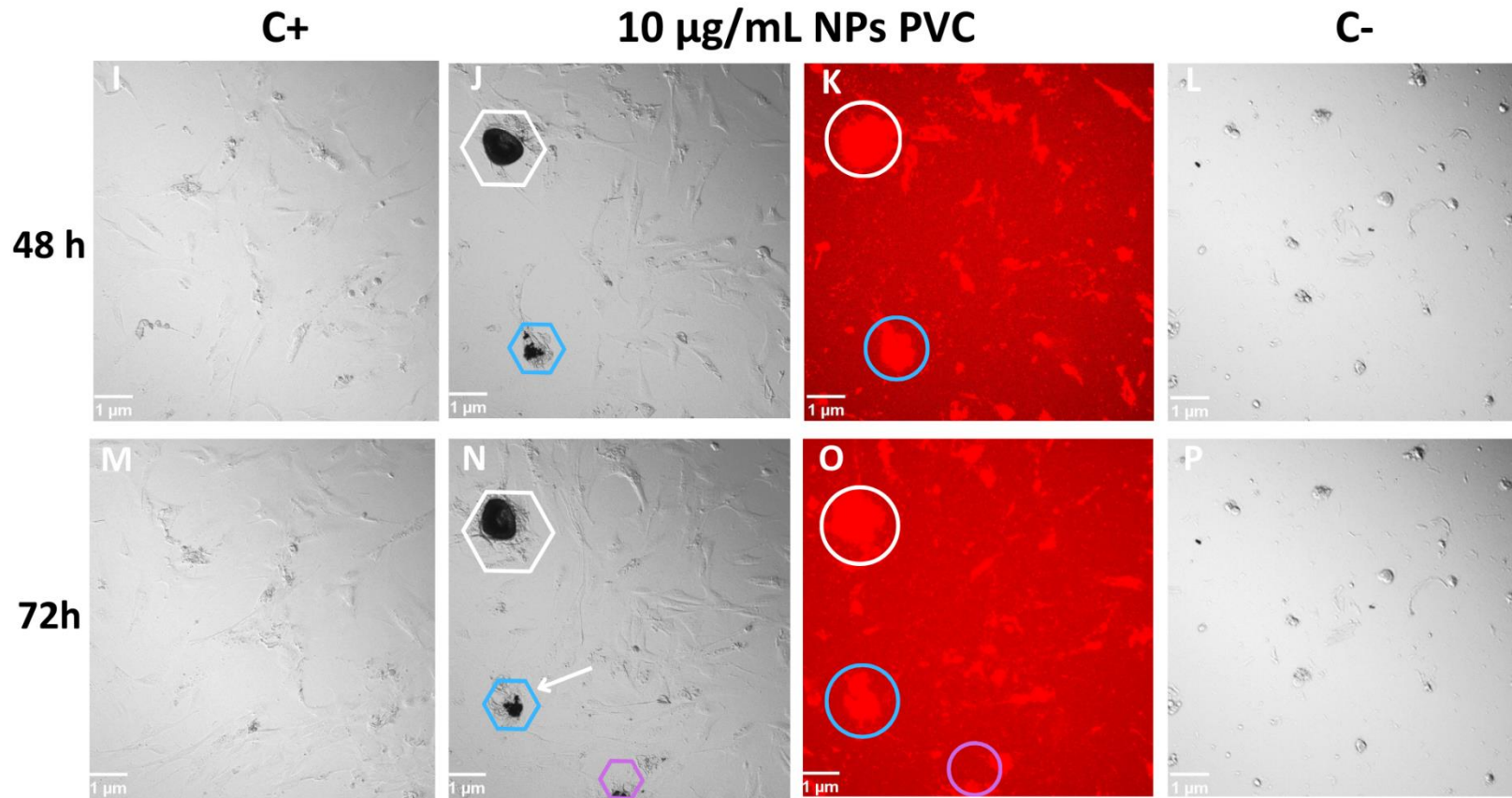


Figura 31-2. Continuación de las micrografías obtenidas mediante microscopía de fluorescencia a 10x. Se muestran los cambios que experimentan los HBPV-3D durante las 0 y 24 h, con NPs de PVC a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Todas las imágenes presentan una escala de 1 μm . Las imágenes I y M, representan al C+, las micrografías J y N son el tratamiento de las NPs de PVC, K y O, denotan las NPs de PVC marcadas con rojo de Nilo, mientras que la L y P, muestran el C-. Es importante mencionar que, la figura del hexágono (blanco, azul y verde) indica los aglomerados de las NPs de PVC (B y F). La flecha indica que los HBPV-3D se acercan a los aglomerados del PVC, sin embargo, los círculos (blanco, azul y verde) indican que se trata de aglomeraciones de NPs de PVC marcadas con rojo de Nilo y los hexágonos (blanco, azul y verde) hace referencia a las NPs de PVC.

También, se indica con flecha color blanco en las imágenes F y N que las células se acercan e ingresan a la partícula plástica y luego retroceden, lo antes mencionado se visualizó mediante el seguimiento del ensayo en 24, 48 y 72 h.

Sin embargo, no se logró observar las partículas de PVC de menor tamaño, por lo consiguiente las partículas se marcaron con rojo de Nilo y se visualizan en las imágenes C, G, K y O, se muestra que en el transcurso del tiempo hay un aumento de fluorescencia tanto de las NPs de PVC de tamaño micro y nano como de los HBPV-3D. Finalmente, en las imágenes D, H, L y P (C-) se observa un cambio de morfología de los HBPV-3D a partir de las 0 al ser comparado con el C+, el cual se incrementa conforme transcurre las 24, 48 y 72 h, que se atribuye al DMSO, el cual ocasiona la muerte de la célula.

3.3. 8 Microscopía confocal

3.3.8.1 Internalización de las NPs de PVC en los HBPV-3D

En las micrografías de la figura 32 se observa una célula control para cada uno de los tiempos transcurridos de 24, 48 y 72 h; en este caso las células no contenían las NPs de PVC. En la figura 32 identificadas con las letras (A, E y I) se muestran las imágenes de contraste de fases, el núcleo (marcado con DAPI) de las células se puede observar en B, F y J, el citoesqueleto (marcado con FITC) en C, G y K y finalmente la reconstrucción de las señales del DAPI y FITC en las imágenes D, H y L. Por otro lado, en la figura 33 se muestran las células incubadas con una concentración de 10 µg/mL para las NPs de PVC, de acuerdo con las imágenes, éstas presentaron un tamaño que osciló de 1 a 4.2 µm.

En las figuras 32 y 33 (A, F y K) se muestran las imágenes de campo claro, el núcleo de las células se observa en B, G y L, el citoesqueleto en C, H y M, mientras que en las imágenes D, I y N se muestran las NPs de PVC teñidas con rojo de Nilo y en E, J y O la reconstrucción de las imágenes de fluorescencia. De manera general, en la figura 33 (E, J, O) se observa que las NPs de PVC son capaces de ser internalizadas por las células, ya que fue evidente su presencia en los tiempos de 24, 48 y 72 h.

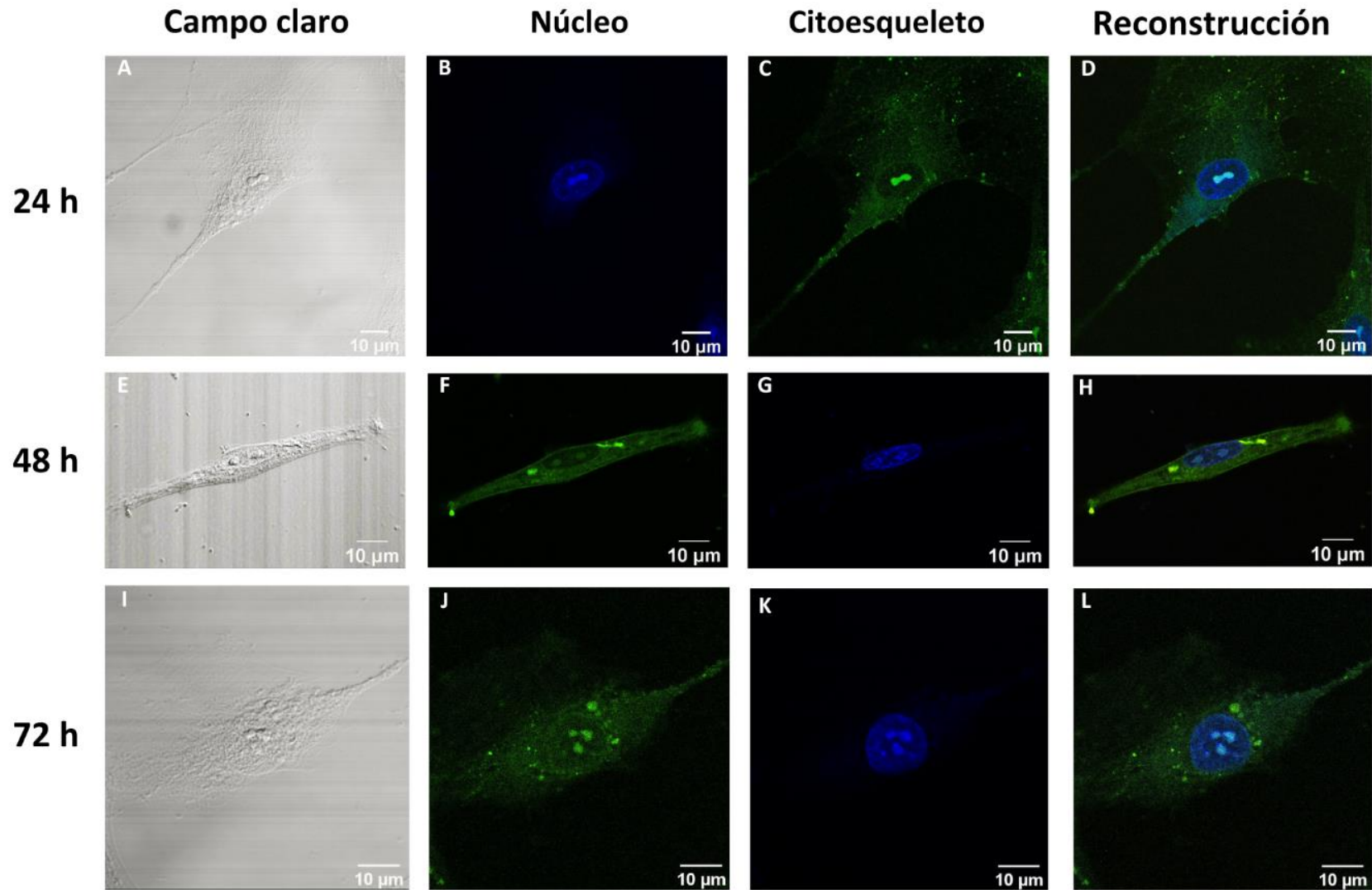


Figura 32. Imágenes del control positivo de los HBPV-3D obtenidas por microscopía confocal. El núcleo fue teñido con DAPI (colorante azul) y el citoesqueleto correspondiente a la actina conjugada con el colorante fluorescente (verde).

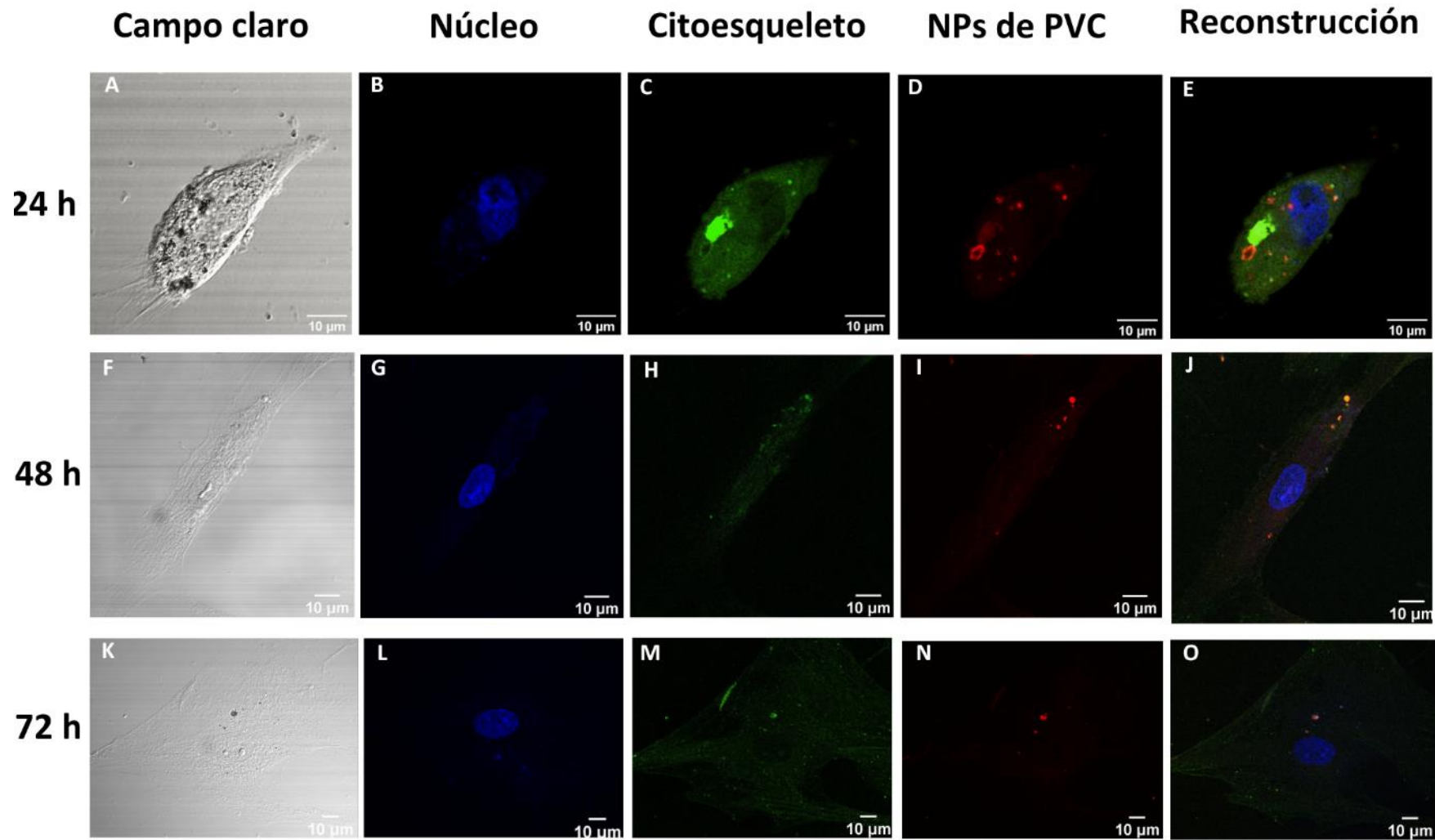


Figura 33. Imágenes de los HBPV-3D con 10 μg de NPs de PVC obtenidas por microscopía confocal. El núcleo fue teñido con DAPI (colorante azul), el citoesqueleto con FITC correspondiente a la actina conjugada con el colorante fluorescente (verde) y las NPs de PVC (rojo de Nilo).

Es importante mencionar, que se observan diferencias importantes en las células que fueron incubadas con las nanopartículas, si las comparamos con las células control. Como se aprecia en las micrografías de la figura 32 (C, G y K) de las células control, la actina que forma parte del citoesqueleto, mantiene casi la misma intensidad de la fluorescencia a las 24, 48 y 72 horas. Y como se aprecia en las imágenes de las células incubadas con NPs de PVC, (figura 33 C, H y M), se ve que la intensidad de la fluorescencia en verde (que corresponde a la actina), fue disminuyendo conforme pasaba el tiempo de incubación, ya que había una menor fluorescencia en las 48 y 72 h.

3.3.8.2 MITO-ID

En las micrografías de la figura 34 se observan una célula control para cada uno de los tiempos transcurridos de 24, 48 y 72 h; en este caso las células no contenían las NPs de PVC. En las figuras 34 (A, E y I) se muestran las imágenes de contraste de fases, el núcleo (marcado con Hoechst) de las células se puede observar en B, F y J, las mitocondrias (marcado con Mito-ID) en C, G y K y finalmente la reconstrucción de las señales del Hoechst y Mito-ID en las imágenes D, H y L. Por otro lado, en la figura 35 se muestran las células incubadas con una concentración de 10 µg/mL para las NPs de PVC, de acuerdo con las imágenes.

En las figuras 37 y 38 (A, F y K) se muestran las imágenes de campo claro, el núcleo de las células se observa en B, G y L, las mitocondrias en C, H y M, mientras que en las imágenes D, I y N se muestran las NPs de PVC teñidas con Rojo de Nilo y en E, J y O la reconstrucción de las imágenes de fluorescencia. Es importante mencionar, que no se observan diferencias en las células que fueron incubadas con las nanopartículas, al ser comparadas con las células control, debido a que, los fluoróforos como el MITO-ID y el rojo de Nilo emiten la señal de fluorescencia en 595 nm y 636 nm respectivamente, por lo que dichas señales se traslapan con respecto a la longitud de onda como se muestra en la figura 23. Es importante mencionar, que se observan diferencias importantes en las células que fueron incubadas con las nanopartículas, si las comparamos con las células control. Como se aprecia en las micrografías de la figura 34 (C, G y K) de las células control, las mitocondrias aumentan su fluorescencia conforme transcurre las horas. Y en las imágenes de las células incubadas con NPs de PVC, (figura 35 C, H y M), se ve que la intensidad de la fluorescencia en rojo (que corresponde a las mitocondrias), fue disminuyendo conforme pasaba el tiempo de incubación, ya que había una menor fluorescencia en las 48 y 72 h.

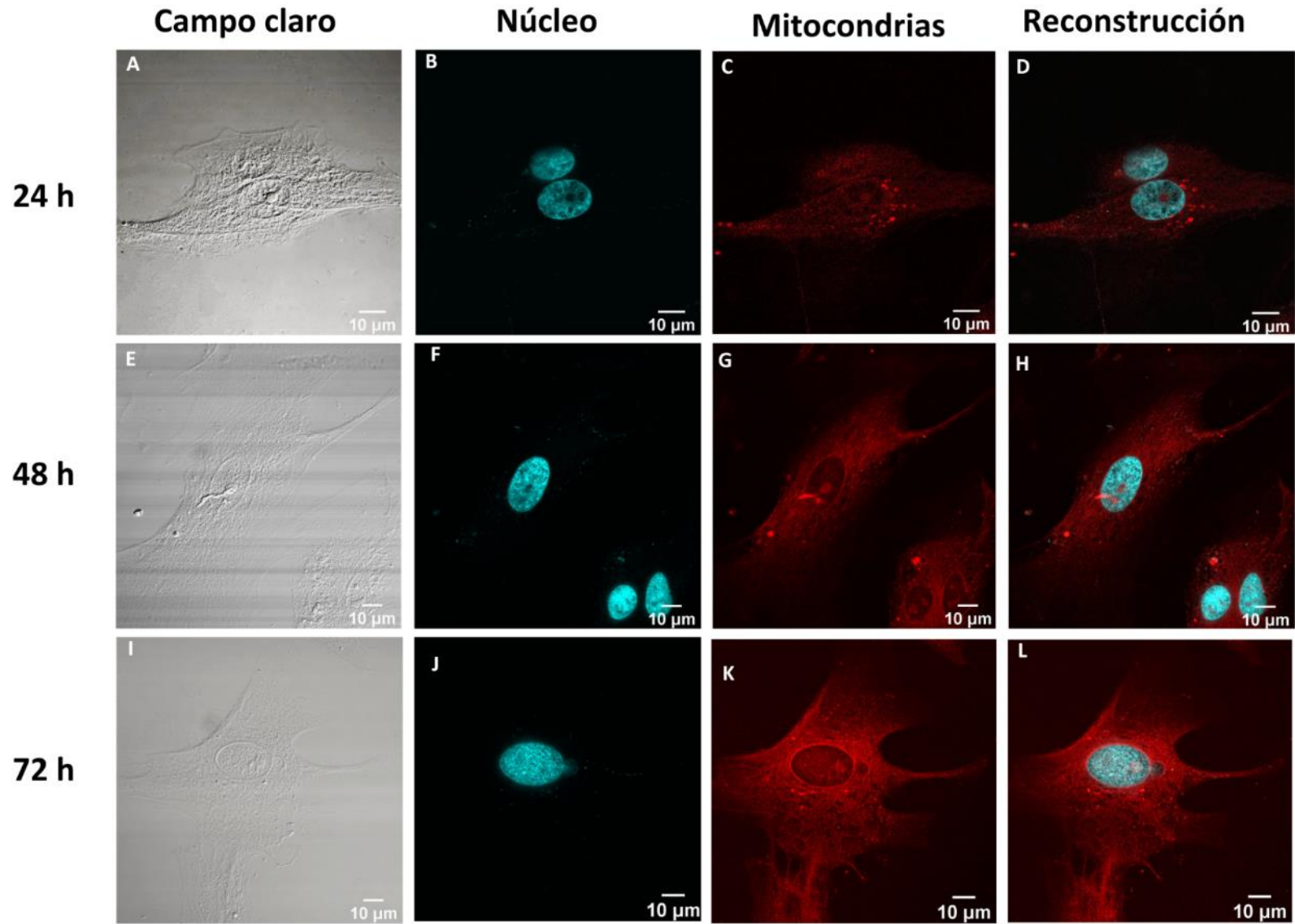


Figura 34. Imágenes del control positivo de los HBPV-3D obtenidas por microscopía confocal. El núcleo fue teñido con Hoechst (colorante azul) y las mitocondrias con Mito-ID (colorante rojo).

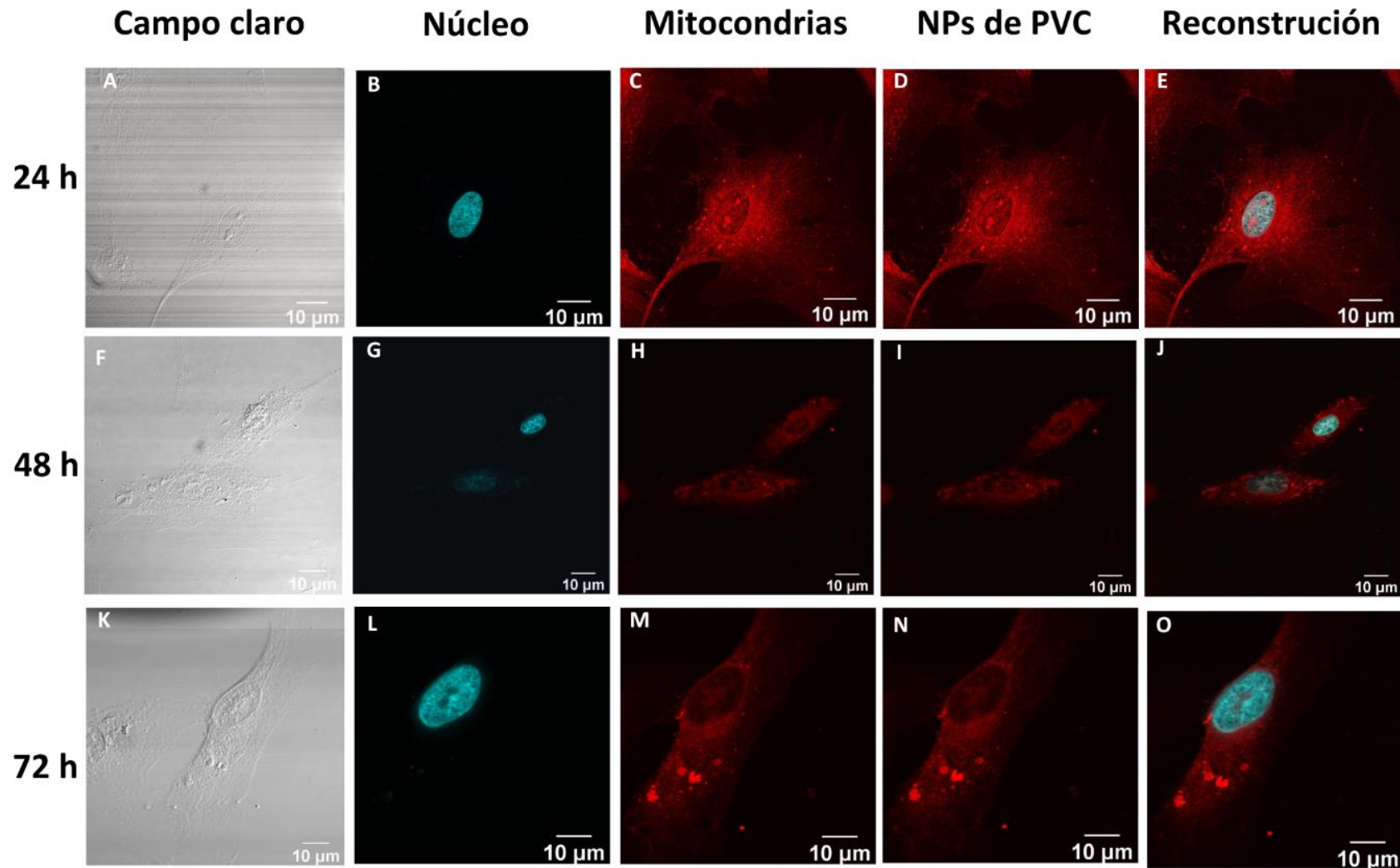


Figura 35. Imágenes de las HBPV-3D con 10 μg de NPs de PVC obtenidas por microscopía confocal. El núcleo fue teñido con Hoechst (colorante azul), las mitocondrias con Mito-ID (colorante rojo) y las NPs de PVC (con rojo de Nilo).

Capítulo 4. Discusión

El problema de la contaminación por plásticos, su fragmentación y la imposibilidad de recuperar del ambiente todo aquello que se ha degradado hasta una escala nanométrica; hace que la obtención de nanoplásticos en el laboratorio sea una práctica necesaria para poder determinar el impacto de estos contaminantes en diferentes organismos. Como ya se mencionó para la obtención de las NPs de PVC, el PVC comercial, fue sometido a envejecimiento con luz UV (proceso de fotodegradación) a 120 °C y 15 psi, llevando a cabo un proceso de degradación térmica. Esto con la finalidad de fragilizar el material simulando las condiciones de envejecimiento por fotodegradación y exposición a los diversos factores ambientales que deterioran al material. Se ha reportado que cuando el polímero es sometido a energías de luz, calor y radiación ionizante, se genera el proceso de deshidrocloración, que consiste en que el PVC libera moléculas de ácido clorhídrico, generando polienos que causan el deterioro del color, propiedades mecánicas y disminución en la resistencia química del polímero (Grause, 2017; Geddes, 1967). Además de lo anterior, para la preparación de las NPs de PVC mediante la técnica top-down, se aprovechó que el PVC presenta características físicas de un material amorfo y alta solubilidad en diferentes solventes orgánicos como el tetrahidrofurano y el dimetilsulfóxido (Grause et al., 2017, Amer et al., 2013; Purmová, 2007; Rabek, 1995; Titow, 1990). Por otro lado, la técnica requirió del uso de un estabilizante para la obtención de las NPs de PVC; una vez que el material original se encontraba disuelto, fue aquí donde el cloruro de calcio dihidratado se utilizó para que actuara como estabilizante y que además funcionó como adsorbente y neutralizante del ácido clorhídrico durante el proceso de fragmentación del PVC (Folarin & Sadiku, 2011).

Es importante mencionar, que el choque térmico más el DMSO junto con el estabilizante, el movimiento constante y el goteo de la solución con el polímero, permitió que el PVC reaccionara y se separara, generando una ruptura en la fuerza intermolecular que interviene en la composición química de este polímero. Esto es posible ya que un rompimiento en los polímeros orgánicos mediante la degradación térmica (fotodegradación debida a la exposición a la luz UV) que actúa sobre las fuerzas de van der Waals y los puentes de hidrógeno en los polímeros (Grause, 2017; Yu et al., 2015; Folarin & Sadiku, 2011; Coreño-Alonso & Méndez-Bautista, 2010).

Es importante mencionar que esta metodología permite la obtención de nanopartículas con una composición, estructura, y forma, similar a lo que se esperaría encontrar en el ambiente (Sangkham et al., 2022; Amobonye et al., 2021), ya que provienen de tuberías de uso común en la construcción y que tienen un deterioro debido a las condiciones ambientales a las que se someten regularmente. Aunado a esto, se

ha logrado obtener un rendimiento del 75% en forma de nanopartículas de PVC. Si comparamos la eficiencia de esta metodología con la de Tanaka et al., (2021), parece menos eficiente, sin embargo, en su metodología utilizaron el polímero puro del PVC (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) y mediante un proceso de precipitación obtuvieron un 95% de eficiencia en la obtención de las NPs de PVC. Al ser comparado con el polímero puro de la industria y la viruta del tubo de PVC, se tiene una diferencia del 20% de eficiencia. Esta diferencia puede atribuirse a la composición de los tubos de PVC de uso en la construcción, el cual contiene rellenos como el carbonato de calcio que ha sido empleado para reducir el costo de la producción, el mejoramiento de las propiedades térmicas, propiedades eléctricas y la rigidez del PVC (Ureta, 1989).

Dicho esto, los tubos de PVC que se usaron para obtener las NPs de PVC son un material compuesto, hecho que se demuestra con los resultados de DRX de las muestras analizadas, ya que los resultados evidenciaron que las NPs de PVC obtenidas presentaban una fase amorfa y una cristalina. Los espectros de DRX se compararon con los reportados por Vasanthkumar et al., (2014) quienes muestran que el espectro presenta un pico amplio de $\sim 15^\circ$ que corresponde a la fase amorfa del PVC, mismo que se puede observar en los difractogramas de la figura 25 de nuestras NPs de PVC. Además, en la muestra del tubo de PVC y PVC envejecido (en forma de viruta) se observa un pico que corresponde a un compuesto de carbonato de calcio, el cual se puede atribuir a los rellenos que se encuentran presentes en el tubo de PVC. En dichos difractogramas, se observó la señal de un compuesto de sulfato de calcio hidratado, que se atribuye al estabilizante utilizado en el proceso de obtención de las nanopartículas. Es importante mencionar que, estos estabilizadores térmicos como el calcio y zinc, que son considerados menos tóxicos, sirven para la absorción y neutralización del ácido clorhídrico. Sin embargo, durante el proceso de degradación de los polímeros se emplean para reemplazar o desplazar los grupos sustituyentes (cloro terciario y alílico), transformar sustancias prodegradantes y prevenir la formación de polienos conjugados (Folarin & Sadiku, 2011; Bao et al., 2008).

Por otro lado, en los espectros de FTIR (figura 26) se detectaron bandas características de los enlaces químicos del cloruro de vinilo en $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, que corresponden a los modos vibracionales de estiramiento antisimétrico y simétrico de los grupos funcionales alifáticos (CH_2 y CH_3) (Yaseen et al., 2021; Bodecchi et al., 2005). Mientras que, en las bandas de $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ se visualizaron los estabilizadores térmicos (carboxilatos de calcio y zinc), que sirven para proporcionar una mayor rigidez en la estructura del tubo de PVC (Fan et al., 2021; Bodecchi et al., 2005). Es importante mencionar que, se observó en los espectros del tubo de PVC y de las NPs de PVC una disminución del porcentaje de la transmitancia en las bandas de 1575 y 1540 cm^{-1} al compararse con la muestra del PVC envejecido, lo antes mencionado puede

estar relacionado con el tratamiento de radiación con luz ultravioleta y esterilización, debido a que se sabe que el proceso de envejecimiento mediante esta técnica puede ocasionar efectos químicos y térmicos en el material del PVC, generando polienos conjugados que da lugar a los grupos carbonilo y peróxidos (Klempová et al., 2023; Fan et al., 2021; Deanin et al., 1970). Esto es de gran utilidad, ya que en varios estudios, se ha reportado que las partículas de plástico; al estar en contacto con la luz UV pueden generar una degradación física y la descomposición del polímero pasando de macropolásticos a micropolásticos y por consiguiente hasta nanoplasticos, por lo que estaríamos obteniendo nanopartículas de PVC con una composición más cercana a lo que encontraríamos en el ambiente (Sangkham et al., 2022; Amobonye et al., 2021; Suhrhoff et al., 2016; Andrady & Neal, 2009; Corcoran et al., 2009; Cózar et al., 2014).

Además, para identificar el polímero orgánico y corroborar que se habían obtenido las NPs de PVC se realizó un análisis mediante espectrometría UV-Vis. En la figura 27 se observó una banda de absorción en los 206 nm, la cual es característica del PVC al comparar con los resultados obtenidos por Klempová et al., (2023) y Monika et al., (2015) quienes previamente obtuvieron el mismo pico en 206 nm.

Es por ello que, para conocer la morfología de nuestras NPs de PVC, se realizó un análisis mediante TEM; en la figura 24 A se observó una forma esferoide y un tamaño promedio de 152 ± 4.2 nm. Por otro lado, en la figura 24 B que se visualizó la distribución de tamaños donde se encontró que la mayor proporción de nanopartículas de PVC está entre 100 a 150 nm. Dichos resultados son comparables con Yip et al., (2022); Tanaka et al., (2021) y Mahadevan & Valiyaveetil, (2021) quienes obtuvieron NPs de PVC utilizando el polímero puro con morfología esférica de un tamaño promedio de 180 ± 6 y 122 ± 1.04 nm.

Para determinar la estabilidad de las NPs de PVC en suspensión, se realizó un análisis con DLS del diámetro hidrodinámico y el potencial zeta, con el objetivo de comprender la interacción de las nanopartículas plásticas con los medios empleados (DMEM y DMEM suplementado) que fueron utilizados en los ensayos de viabilidad y proliferación. En la tabla 4 se observó que, al aumentar la concentración de las partículas, el diámetro hidrodinámico de las NPs de PVC aumenta y el potencial zeta se mantiene en una carga negativa. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en la literatura, donde se ha observado que el diámetro hidrodinámico de las partículas plásticas cambia debido a los cambios en su superficie al interaccionar con los medios DMEM y DMEM suplementado. Esto se atribuye a que estos medios contienen glucosa, aminoácidos, vitaminas, piruvato de sodio, factores de crecimiento, proteínas, oligoelementos, vitaminas y hormonas (Thermo Fischer, 2023; Sigma Aldrich, 2023; Li et al, 2021; Stapleton, 2021; Voronovic et al., 2021; Monika et al., 2015). Estos resultados se complementan con el trabajo previo de Monti et al., (2015); quienes mencionan que la estabilidad coloidal de las partículas

poliméricas se ve afectada por la presencia de proteínas séricas. Sin embargo, cabe mencionar que Magri et al., (2018) señalan que las proteínas séricas mejoran la estabilidad de partículas plásticas. Por lo que se necesitarían análisis más exhaustivos para obtener un consenso.

Además de los análisis en medios de cultivo, se obtuvieron mediciones en agua desionizada donde se observó un aumento de tamaño de las NPs de PVC. Esto se ha atribuido a la formación de los agregados que son ocasionados por la hidrofobicidad del PVC (Zhang et al.,2023; Zhang et al, 1999). Es importante mencionar que, el diámetro hidrodinámico y potencial Z no se ha reportado con el DMEM y DMEM suplementado en las NPs de PVC. Pero, para el medio acuoso Mahadevan & Valiyaveettil, (2021) encontraron un tamaño de $\sim 125 \pm 14$ nm y un potencial zeta de -35.3 mV.

Con respecto a la estabilidad de las NPs de PVC (figura 28) se obtuvo que en las soluciones ácidas (pH 1 a 3) las NPs de PVC tienden a aglomerarse, aunque en las disoluciones de fosfatos (pH 4 a 5) y acetatos (pH 6 a 8) las partículas se encuentran más estables. Los autores Li et al., (2023); Wan et al., (2021) y da Costa et al., (2016) han observado que las soluciones ácidas al interactuar con los nanoplásticos pueden afectar sus propiedades fisicoquímicas como su atracción electrostática.

Al igual que en la mayoría de los estudios relacionados con los MPs y NPs a bajas concentraciones, existe la consistencia de poca o nula toxicidad en estudios *in vitro*. Sin embargo, se ha observado un aumento en la actividad metabólica de diferentes líneas celulares (Aguilar-Guzmán et al., 2022; Mahadevan & Valiyaveettil, 2021; Rodríguez-Hernández et al., 2019, Hwangab et al., 2019; Lim et al.,2019; Wu et al, 2019; Magri et al., 2018; Schirinzi et al., 2017). Al comparar nuestros resultados de los en los ensayos de viabilidad y proliferación celular con las concentraciones de las NPs de PVC a 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL y 1 mg/mL; se puede observar que las células tienen una respuesta a corto y largo plazo al interactuar con las NPs de PVC en los ensayos de MTT y Alamar Blue (figuras 29 y 30). Con respecto a los ensayos de MTT (figura 29) se observó una disminución en la viabilidad y proliferación celular en las 24, 48 y 72 h, por lo que se interfiere que la interacción prolongada de NPs de PVC deteriora las funciones celulares. Es importante mencionar que con los resultados obtenidos podemos inferir que la disminución en la viabilidad celular a diferentes concentraciones de NPs de PVC, se origina por la reducción del NADH, NADPH, FADH y FMNH en el medio de cultivo, lo cual se debe a una disminución en la conversión del MTT en formazán (Stock et al., 2020; Wang et al., 2020; Winikoff et al., 2005). Así mismo, la disminución de viabilidad celular se puede atribuir a la interacción intracelular con la partícula plástica, las sales de tetrazolio y a la solución solubilizante (50% alcohol isopropílico y 50% de ácido acético) la cual fue utilizada para disolver los cristales de formazán. Debido a que, algunos autores han reportado la toxicidad celular

de las sales de tetrazolio y que el alcohol isopropílico con ácido acético puede destruir las células al adicionarse en el ensayo de MTT (Stock et al., 2020; Rampersad, 2012; McClusket et al., 2005; Bensaid, et al., 2000) es necesario determinar la concentración óptima de las sales de tetrazolio y el tiempo de incubación para no dañar a las células de los HBPV. Además, Xu et al., (2002) han reportado que el PVC es tóxico debido a aditivos como los sulfonatos de sodio y benceno, el lauril éter sulfato sódico, dioctil sulfosuccinato de sodio.

Debido a los resultados obtenidos en el ensayo de MTT, se comparó con el ensayo de citotoxicidad de Alamar Blue, el cual no es tóxico y se encarga de monitorear continuamente a las células en el cultivo. El Alamar Blue puede ser reducido por NADPH, FADH, FMNH, NADH, el citocromo c, las reductasas mitocondriales (SDH), y enzimas (diaforasas, dihidrolipoamina deshidrogenasa y el flavin reductasa) que se encuentran ubicados en el citoplasma de la célula (Rampersad, 2012; Brusnichkin et al., 2010; Garrido et al., 2006). Con el ensayo de Alamar Blue (figura 30) se observó un aumento de viabilidad celular con las diferentes concentraciones de las NPs de PVC al ser comparados con los valores obtenidos en el control positivo. Es importante destacar que, la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tuvo un mayor aumento de viabilidad celular a las 48 h. De manera general, este tipo de aumento de viabilidad se puede atribuir a que las NPs de PVC pueden atraer diferentes nutrientes que favorecen el crecimiento de los HBPV-3D y a que las partículas plásticas son químicamente inertes debido a que no dispersan su potencial tóxico en las concentraciones analizadas y en los componentes de los reactivos utilizados (Stock et al, 2021; Sieg et al., 2017; Teuten et al., 2009).

Al realizar una comparación general de los análisis *in vitro* nos lleva a pensar que las NPs de PVC pueden ser acarreadores de nutrientes que aumentan la viabilidad y proliferación celular. Sin embargo, pueden interferir con el crecimiento de los HBPV-3D, es por ello que para comprender la interacción de las NPs de PVC con la línea celular se realizaron análisis de los ensayos de internalización. En las micrografías de fluorescencia (figura 31-1 y 2), se observaron la presencia de partículas de PVC de un tamaño macro, micro y nano. Las partículas de PVC que se observan con dimensiones en la escala micrométrica y visibles fácilmente en las micrografías debido a la fluorescencia del rojo Nilo, se pueden atribuir a que se formaron aglomerados asociada a la concentración utilizada de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Por lo consiguiente, las NPs de PVC al interactuar con el medio y el tiempo en que se encuentran suspendidas pueden formar aglomerados. Por otro lado, es importante considerar que, al estar en medio de cultivo, las NPs de PVC tenderán a formar coronas proteicas, las cuales es sabido que tienen un impacto en la absorción e internalización en las líneas celulares (Li et al, 2021; Stapleton, 2021; Voronovic et al., 2021; Monika et al., 2015; Monti et al., 2015).

Finalmente, para corroborar la internalización de las NPs en las células, se realizaron observaciones mediante microscopía confocal (figura 32 y 33), tiñendo las NPs de PVC con rojo de Nilo para su visualización en el interior de los HBPV- 3D. De manera general, se pudo demostrar que las NPs de PVC pueden internalizar a los HBPV-3D en el tiempo de 24, 48 y 72 h. Esta internalización puede estar mediada por los microfilamentos del citoesqueleto de los HBPV-3D debido a que, es notorio un decremento de intensidad del citoesqueleto en el transcurso del tiempo. Aguilar-Guzmán et al., (2022); Liu et al., (2021) y Monti et al., (2015) han reportado que la captación e internalización de los MPLs y NPLs se origina principalmente por los microfilamentos de las células, generando así un proceso de macropinocitosis. También se ha visto que, las partículas poliméricas de un tamaño menor a 200 nm pueden ser internalizadas por vías endocíticas, mediante la interacción de la bicapa lipídica de la membrana plasmática (Schröter & Ventura, 2022, Mahadevan & Valiyaveetil, 2021; Wu et al., 2019, Lunov et al., 2011).

Capítulo 5. Conclusiones

5.1 Conclusiones

Por todo lo anterior podemos decir que las nanopartículas de PVC obtenidas por la técnica top-down, con un tamaño promedio de 152 ± 4.2 nm, con una forma semi esférica, son internalizadas por los pericitos vasculares humanos HPBV. La interacción de las células HPBV con las nanopartículas de PVC ocasionaron que disminuyera la actividad proliferativa de las células en especial a una concentración de $10 \mu\text{m}/\text{mL}$, de acuerdo con los resultados obtenidos por MTT. Sin embargo, al comparar estos últimos con los resultados de resazurina, podemos ver que la reducción de la resazurina fue mayor en comparación con las células control. Sin embargo, en las imágenes de microscopía de contraste de fase, no se vio una diferencia entre la cantidad de células en la muestra control y las experimentales, por lo que se atribuye que existe una alteración en su actividad metabólica básica asociada a sus funciones reductoras mitocondriales. Esto demuestra que es importante continuar con más estudios e incluir aquellos en organismos más complejos mediante ensayos *in vivo*, para determinar las afecciones que estos contaminantes emergentes puedan tener en el cerebro y en otros órganos.

5.2 Perspectivas

Se puede resumir que los resultados obtenidos en este trabajo, se detectaron algunos efectos que generan las NPs de PVC en los HBPV-3D. Sin embargo, es necesario repetir el experimento del apartado de Mito-ID Red, tiñendo las NPs de PVC con FITC para poder visualizar las partículas plásticas y así poder determinar si internalizan a la línea celular. Se planea evaluar los ensayos de viabilidad y proliferación celular y los ensayos de internalización de las NPs de PVC en las líneas celulares que conforman la barrera hematoencefálica como son los astrocitos humanos (HA) y las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). Además, es necesario comparar los experimentos realizados con partículas de mayor tamaño, para poder observar las diferencias que existen en los microplásticos y nanoplásticos. Finalmente, se propone evaluar la permeabilidad mediante el modelo *in vitro* de la barrera hematoencefálica que consiste en un monocultivo y co-cultivo en presencia de las partículas de PVC.

Literatura citada

- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 41-53. doi: [10.1038/nrn1824](https://doi.org/10.1038/nrn1824)
- Abhilash, V., Rajender, N., & Suresh, K. (2016). X-ray diffraction spectroscopy of polymer nanocomposites. *Spectroscopy of Polymer Nanocomposites*, 4, 10–451. doi:[10.1016/B978-0-323-40183-8.00014-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40183-8.00014-8)
- Aguilar-Guzmán, J. C., Bejtka, K., Fontana, M., Valsami-Jones, E., Meza-Villezcás, A., Vazquez-Duhal, R., & Rodríguez-Hernández A. G. (2022). Polyethylene terephthalate nanoparticles effect on RAW 264.7 macrophage cells. *Microplastics and Nanoplastics*, 2(9), 1- 15. doi: [10.1186/s43591-022-00027-1](https://doi.org/10.1186/s43591-022-00027-1)
- Alimi, O. S., Farner- Budarz, J., Hernandez, L. M., & Tufenki, N. (2018). Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Environments: Aggregation, Deposition, and Enhanced Contaminant Transport. *Environmental Science and Technology*, 52(4), 1704-1724. doi: [10.1021/acs.est.7b05559](https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05559)
- Allen, N., & Barres, B. (2009). Glia — more than just brain glue. *Nature*, 457, 675–677. doi: [10.1038/457675a](https://doi.org/10.1038/457675a)
- Álvarez, D. O. (2021). Plástico. Recuperado el 8 de noviembre de 2023. <https://concepto.de/plastico/>
- Amaru, R., Silvestre, J., Torres, G., Miguez, H., Peñaloza, R., Araoz, R., & Cuevas, H. (2005). Primera experiencia en aislamiento de células endoteliales humanas en Bolivia. *Cuadernos del Hospital de clínicas*, 50(2), 49-54. <http://www.scielo.org.bo/pdf/chc/v50n2/a07.pdf>
- Ameer, A., Mustafa, A., Ahmed, A., & Emad, Y. (2013). Synthesis and Characterization of polyvinyl Chloride chemically modified by amines. *Journal of Polymer Chemistry*, 3(1), 11-15. doi: [10.4236/ojpcem.2013.31003](https://doi.org/10.4236/ojpcem.2013.31003)
- American Chemistry Council. (2017). 2017 United States National Postconsumer Plastic Bottle Recycling Report. Recuperado el 10 de noviembre del 2023. <https://plasticsrecycling.org/images/library/2017-postconsumer-bottle-recycling-report.pdf>
- Amobonye, A., Bhagwat, P., Raveendran, S., Singh, S., & Pillai, S. (2021) Environmental Impacts of Microplastics and Nanoplastics: A Current Overview. *Frontiers in Microbiology*. 12(768297), 1-21. doi: [10.3389/fmicb.2021.768297](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.768297)
- Andrady, A. L. (2020). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596-1605. doi: [10.1016/j.marpolbul.2011.05.030](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030)
- Andrady, A. L., & Neal, M. A. (2009). Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1977-1984. doi: [10.1098/rstb.2008.0304](https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0304)
- Annu, Sartaj, A., Qamar, Z., Md, S., Alhakamy, N. A., Baboota, S., & Ali, J. (2022). An Insight to Brain Targeting Utilizing Polymeric Nanoparticles: Effective Treatment Modalities for Neurological Disorders and Brain Tumor. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 1-18. doi:[10.3389/fbioe.2022.788128](https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.788128)
- Aslantürk, Ö. S. (2018). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity A Predictable Risk to Our Actual World*, 1-18. doi: [10.5772/intechopen.71923](https://doi.org/10.5772/intechopen.71923)

- Asociación Nacional de la Industria de Química (ANIQ). (2022). PVC (Policloruro de Vinilo). Recuperado el 10 de noviembre del 2023. <https://aniqu.org.mx/premiopvc/assets/docs/Libro%20PVC-WEB.pdf>
- Aparicio, M. E., & Carbajal, G. G. (2021). Utilidad de la difracción de rayos x en las nanociencias. *Mundo nano*, 3(2), 1-4. <https://www.scielo.or.mx/scielo.php?scrip=sciarttext&pid=S2448-56912010000200062>
- Arepack. (2018). ¿Qué es el PET? Recuperado el 10 de noviembre del 2023. <https://www.arapack.com/faq/que-es-el-pet/>
- Armulik, A., Abramsson, A., & Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circulation Research*, 97(6), 512-523. doi: [10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7)
- Arnáiz, C., Isac, L., & Lebrato, J. (2000). Determinación de la biomasa en procesos biológicos. *Tecnología del agua*, 20(205). http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/tvolke/00_Determin-BM.pdf
- Barrera, L. M., Drago, M. E., Pérez, J., Zamora, A. C., Gómez, F., Saninz, T. R. & Mendoza, F. (2004). Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(1), 42-55. <https://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-2004/in041g.pdf>
- Bao, Y., Huang, Z., Li, S., & Weng, Z. (2008). Thermal stability, smoke emission and mechanical properties of poly (vinyl chloride)/hydrotalcite nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability*, 93(2), 448-455. doi: [10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.014](https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.014)
- Becnel, J. J. (2012). *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Springer (2nd Ed.). <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4020-5933-9>
- Bellasi, A., Binda, G., Pozzi, A., Boldrocchi, G., & Bettinetti, R. (2021). The extraction of microplastics from sediments: An overview of existing methods and the proposal of a new and green alternative. *Chemosphere*, 278(130357), 1-15. doi: [10.1016/j.chemosphere.2021.130357](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130357)
- Bensaid, A., Thierie, J., & Penninckx, M. (2000). The use of the tetrazolium salt XTT for the estimation of biological activity of activated sludge cultivated under steady-state and transient regimes. *Journal of Microbiological Methods*, 40(3), 255-263. doi: [10.1016/s0167-7012\(00\)00130-5](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00130-5)
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. doi: [10.1016/j.jconrel.2016.06.017](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017)
- Bhowmik, P. K., (2006). Light-Associated Reactions of Synthetic Polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 128(50), 15930-16412. doi: [10.1021/ja069776b](https://doi.org/10.1021/ja069776b)
- Bodecchi, L. M., Cocchi, M., Malagoli, M., Manfredini, M., & Marchetti, A. (2005). Application of infrared spectroscopy and multivariate quality-control methods in PVC manufacturing. *Analytica Chimica Acta*, 554(1-2), 207–217. doi: [10.1016/j.aca.2005.08.023](https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.08.023)
- Boncler, M., Różalski, M., Krajewska, U., Podśędek, A., & Watala, C. (2014). Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 69(1), 9-16. doi:[10.1016/j.vascn.2013.09.003](https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.09.003)
- Borisova, T. (2018). Nervous System Injury in Response to Contact With Environmental, Engineered and

- Planetary Micro- and Nano-Sized Particles. *Frontiers in Physiology*, 9(728), 1-16 doi: [10.3389/fphys.2018.00728](https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00728)
- Bouwmeester, H., Hollmany, P. C., & Peters, R. J. (2015). Potential health impact of environmentally released micro and nanoplastics in the human food production chain experiences from nanotoxicology. *Environmental science & technology*, 49(15), 8932-8947. doi: [10.1021/acs.est.5b01090](https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01090)
- Boyes, W. K., & van Thriel C. (2020). Neurotoxicology of Nanomaterials. *Chemical Research Toxicological*, 33(5), 1121-1144. doi: [10.1021/acs.chemrestox.0c00050](https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00050)
- Brusnichkin, A. V., Nedosekin, D. A., Galanzha, E. I., Vladimirov, Y. A., Shevtsova, E. F., Proskurnin, M. A., & Zharov, V. P. (2010). Ultrasensitive label-free photothermal imaging, spectral identification, and quantification of cytochrome c in mitochondria, live cells, and solutions. *Journal of biophotonics*, 3(12), 791-806. doi: [10.1002/jbio.201000012](https://doi.org/10.1002/jbio.201000012)
- Cabrera-Maqueda, J. M., Fuentes, L., Valero, G., Baidez, A. E., García E., Díaz, J., & García-Vázquez, E. Difusión de los antibióticos en el sistema nervioso central. (2018). *Revista Española de Quimioterapia*, 31(1), 1-12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6159365/#cit0003>
- Carbery, M., O'Connor, W., & 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. doi: [10.1016/j.envint.2018.03.007](https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.007)
- Carranza, A. A, García, T., Vizuet, J., & Ruíz, M. A. (2010). Contribuciones del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares al avance de la Ciencia y la Tecnología en México, [Archivo PDF]<http://www.inin.gob.mx/documentos/publicaciones/contridelinin/Cap%C3%ADtulo%209.pdf>
- Castillo, F. D. (2012). Conformado de materiales plástico [Archivo PDF] http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/pagina_ingenieria/mecanica/mat/mat_mec/m6/conformado%20de%20plasticos.pdf
- Chem Tube 3D. (2022). Polyvinyl Chloride Poly(chloroethene) PVC. Recuperado el 10 de noviembre del 2023. <https://www.chemtube3d.com/pvcf/>
- Cohen, M. P., Frank, R. N., & Khalifa, A. A. (1980). Collagen production by cultured retinal capillary pericytes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 19(1), 90-94. doi: [10.1016/S0014-4835\(88\)80025-3](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(88)80025-3)
- Rochman, C., Primpke S., Lync, J., Hapich, H., Munno, K., De Frond H., & Herodoto, O. (2020). Base de datos Open Specy. Recuperado el 15 de noviembre. <https://openanalysis.org/openspecy/>
- Cole, M., Webb, H., Lindeque, P. K., Fileman, E. S., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2015). The Impact of Polystyrene Microplastics on Feeding, Function and Fecundity in the Marine Copepod *Calanus helgolandicus*. *Environmental Science and Technology*, 49(2), 1130– 1137. doi: [10.1021/es504525](https://doi.org/10.1021/es504525)
- Corcoran, P. L., Biesinger, M. C., & Grifi, M., (2009). Plastics and beaches: a degrading relationship. *Marine Pollution Bulletin*, 58, 80–84. doi: [10.1016/j.marpolbul.2008.08.022](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.08.022).
- Coreño-Alonso, J., & Méndez-Bautista, M. T. (2010). Relación estructura-propiedades de polímeros.

Educación química, 21(4), 291-299.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187893X2010000400006&lng=es&tlng=es.

- Cristán, A., Ize, I., & Gavilán, A. (2003). La situación de los envases de plástico en México. *Gaceta Ecológica*, 69, 67-82. <https://www.redalyc.org/pdf/539/53906905.pdf>
- Cózar, A., Echevarría, F., González-Gordillo, J. I., Irigoien, X., Ubeda, B., Hernández-León, S., Palma, A. T., Navarro, S., García-de-Lomas, J., Ruiz, A., Fernández-de-Puelles, M. L., & Duarte, C. M. (2014). Plastic debris in the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 17–19. doi: [10.1073/pnas.1314705111](https://doi.org/10.1073/pnas.1314705111).
- da Costa, J. P., Santos, P. S., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2016). (Nano) plastics in the environment—Sources, fates and effects. *Science of the total environment*, 566(567), 15-26. doi: [10.1016/j.scitotenv.2016.05.041](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.041)
- Dai, M., Lin, Y., El-Amouri S. S., Kohls, M., & Pan, D. (2018). Comprehensive evaluation of blood-brain barrier-forming micro-vasculatures: Reference and marker genes with cellular composition. *PLoS ONE*, 13(5), 1-21. doi: [10.1371/journal.pone.0197379](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197379)
- Daneman, R., & Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), 1-24. doi: [10.1101/cshperspect.a020412](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412)
- Deanin, R. D., Orroth, S. A., Eliassen, R. W., & Greer, T. N. (1970). Mechanism of ultraviolet degradation and stabilization in plastics. *Polymer Engineering and Science*, 10(4), 228–234. doi: [10.1002/pen.760100408](https://doi.org/10.1002/pen.760100408)
- de Boer, A., & Gaillard, P. Blood–brain barrier dysfunction and recovery. (2006). *Journal of Neural Transmission*, 113(4), 455-462. doi: [10.1007/s00702-005-0375-4](https://doi.org/10.1007/s00702-005-0375-4)
- Dutta, A. (2017). Spectroscopic methods for nanomaterials characterization, *Micro and Nano Technologies*, 73-93. doi: [10.1016/B978-0-323-46140-5.00004-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46140-5.00004-2)
- Edward, J. T. (1970). Molecular volumes and the Stokes-Einstein equation. *Journal of Chemical Education*, 47(4), 261–270. doi: [10.1021/ed047p261](https://doi.org/10.1021/ed047p261)
- Envasilia. (2018). Tipos de plástico. Recuperado el 10 de noviembre del 2023 <https://www.ensavelia.com/blog/tipos-de-plasticos-ide7.htm>
- Eriksen, M., Lebreton L. C., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., Galgani, F., Ryan, P.G., & Reisser J. (2014). Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS One*, 9(12), 1-15. doi: [10.1371/journal.pone.0111913](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111913)
- Escobar, A., & Gómez, B. (2008). Barrera hematoencefálica. Neurobiología, implicaciones clínicas y efectos del estrés sobre su desarrollo. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 9(5), 395-405. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmexneu/rmn-2008/rmn085f.pdf>
- Escobedo-Nicot, M., Herold-García, S., Ferreira-Gomes, L., Machado, C, Monteiro- Pereira, E, & Delgado-Falke, S. y Betzel, C. (2019). Dynamic Light Scattering (DLS): Principles, Perspectives, Applications to Biological Samples. *Radiation in Bioanalysis*, 8, 173–193. doi: [10.1007/978-3-030-28247-9_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-28247-9_6)

- Falke S., & Betzel C. (2019). Dynamic Light Scattering (DLS): Principles, Perspectives, Applications to Biological Samples. *Radiation in Bioanalysis*, 8, 173-193. doi: [10.1007/978-3-030-28247-9_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-28247-9_6)
- Fan, C., Huang, Y. Z., Lin, J. N., & Li, J. (2021). Microplastic constituent identification from admixtures by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy: The use of polyethylene terephthalate (PET), polyethylene (PE), polypropylene (PP), polyvinyl chloride (PVC) and nylon (NY) as the model constituents. *Environmental Technology & Innovation*, 23(101798), 1-10. doi: [10.1016/j.eti.2021.101798](https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101798)
- Ferreira, I., Venâncio, C., Lopes, I., & Oliveira, M. (2019). Nanoplastics and marine organisms: What has been studied? *Environmental Toxicological and Pharmacology*, 67, 1-7. doi: [10.1016/j.etap.2019.01.006](https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.01.006)
- Folarin, O. M., & Sadiku, E. R. (2011). Thermal stabilizers for poly (vinyl chloride): A review. *International Journal of Physical Sciences*, 6(18), 4323-4330. doi: [10.5897/IJPS11.654](https://doi.org/10.5897/IJPS11.654)
- Font, W. E. (2017). Clasificación morfológica de células endoteliales de venas de cordón umbilical humano (HUVEC) en imágenes digitales. *Revista Cubana de Ciencias Informáticas*, 12(1), 1-13. <https://www.redalyc.org/journal/3783/378360709001/html/>
- Foord, R., Jakeman, E., Oliver, C., Pike, E., Blagrove, R., Wood, E., & Peacocke, A. (1970) Determination of diffusion coefficients of haemocyanin at low concentration by intensity fluctuation spectroscopy of scattered laser light. *Nature*, 227(5255), 242-245. doi: [10.1038/227242a0](https://doi.org/10.1038/227242a0)
- Forbes (2021). México es autosuficiente en producción de PVC: Anipac. Recuperado el 10 de noviembre del 2023. <https://www.forbes.com.mx/mexico-es-autosuficiente-en-produccion-de-pvc-anipac/>
- Ford, B. J., Bradbury, S., & Joy, D. C. (2023). Transmission electron microscope. Recuperado el 15 de noviembre del 2023. <https://www.britannica.com/technology/transmission-electron-microscope>
- Gaffney, J. S., Marley, N. A., & Jones, D. E. (2012). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Characterization of Material*, 101, 1104-1135. doi: [10.1002/0471266965.com107.pub2](https://doi.org/10.1002/0471266965.com107.pub2)
- García, D., Balart R., Crespo J. E., & López J. (2006). Mechanical properties of recycled PVC blends with styrenic polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 101(4), 2464-2471. doi: [10.1002/app.23484](https://doi.org/10.1002/app.23484)
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., & Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, 13(9), 1423-1433. doi: [10.1038/sj.cdd.4401950](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401950)
- Geddes, W. C. (1967). Mechanism of PVC Degradation. *Rubber Chemistry and Technology*, 40(1), 177-216. doi: [10.5254/1.3539041](https://doi.org/10.5254/1.3539041)
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), 1-5. doi: [10.1126/sciadv.1700782](https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782)
- Grause, G., Hirahashi, S., Toyoda, H., Kameda, T., & Yoshioka, T. (2017). Solubility parameters for determining optimal solvents for separating PVC from PVC-coated PET fibers. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 19(2), 612-622. doi: [10.1007/s10163-015-0457-9](https://doi.org/10.1007/s10163-015-0457-9)
- Grodzicki, W., Dziendzikowska, K., Gromadzka-Ostrowska, J., & Kruszewski, M. (2021). Nanoplastic Impact on the Gut-Brain Axis: Current Knowledge and Future Directions. *International Journal of*

Molecular Sciences, 22(23), 1-16. doi: [10.3390/ijms222312795](https://doi.org/10.3390/ijms222312795)

- Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., & Matías-Guiu, J. (2015). Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *Neurología*, 30(2), 119-129. doi: [10.1016/j.nrl.2012.12.007](https://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.12.007)
- Hassan, P. A., Rana, S., & Verma, G. (2015). Making Sense of Brownian Motion: Colloid Characterization by Dynamic Light Scattering. *Langmuir*, 31(1), 3–12. doi: [10.1021/la501789z](https://doi.org/10.1021/la501789z)
- Helmetine, A. M. (2020). Plastic Definition and Examples in Chemistry. Recuperado el 8 de noviembre del 2023. <https://www.thoughtco.com/plastic-chemical-composition-608930L>
- Hermidia, E. (2011). Polímeros. Guía didáctica. Ministerio de Educación. Instituto Nacional de Educación Tecnológica [Archivo PDF]. <http://www.bnm.me.gov.ar/giga1/documentos/EL007270.pdf>
- Hibbs, A. R. (2004). *Confocal microscopy for biologists*. Springer Science & Business Media LLC. (2nd Ed.). <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Y0YyBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT16&dq=confocal+microscopy&ots=gqvnUif2Jb&sig=YqNSZEXm7Ula3Yuzzt97GdnjUc#v=onepage&q=confocal%20microscopy&f=false>
- Hirschi, K. K., & D'Amore, P. A. (1996). Pericytes in the microvasculature. *Cardiovascular Research*, 32(4), 687-698. doi: [10.1159/000047855](https://doi.org/10.1159/000047855)
- Hirt, N., & Body -Malapel, M. (2020). Immunotoxicity and intestinal effects of nano- microplastics: a review of the literature. *Particle and Fibre Toxicology*, 17(1), 1-22. doi: [10.1186/s12989-020-00387-7](https://doi.org/10.1186/s12989-020-00387-7)
- Hoelting, L., Scheinhardt, B., Bondarenko, O., Schildknecht, S., Kapitzka, M., Tanavde, V., Tan, B., Lee, Q. Y., Mecking, S., Leist, M., & Kadereit, S. (2013). A 3-dimensional human embryonic stem cell (hESC)-derived model to detect developmental neurotoxicity of nanoparticles. *Archives of Toxicology*, 87(4), 721-33. doi: [10.1007/s00204-012-0984-2](https://doi.org/10.1007/s00204-012-0984-2)
- Honus, S., Kumagai, S., Fedorko, G., Molnár, V., & Yoshiaka, T. (2018). Pyrolysis gases produced from individual and mixed PE, PP, PS, PVC, and PET-Part I: Production and physical properties. *Fuel*, 221, 3346-360. doi: [10.1016/j.fuel.2018.02.074](https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.02.074)
- Hull, A. W. (1919). A new method of chemical analysis. *Journal of the American Chemical Society*, 41(8), 1168–1175. doi: [10.1021/ja02229a003](https://doi.org/10.1021/ja02229a003)
- Hwangab, J., Choia, D., Han, S., Choi, D., & Hong, J. (2019). An assessment of the toxicity of polypropylene microplastics in human derived cells. *Science of The Total Environment*, 684, 657-669. doi: [10.1016/j.scitotenv.2019.05.071](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.071)
- International Centre for Diffraction Data. (1941). Bases de datos de planos cristalográficos. Recuperado el 10 de noviembre del 2023. <https://www.icdd.com/>
- Inkson, B. J. (2016). Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*, 17–43. doi: [10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X)
- Jawad, H. M., Shallal, I., & Hassoni, M. (2019). Experimental and theoretical study of (PVC) nanoparticles prepared by laser ablation in ethanol. *AIP Conference Proceedings*, 2123(1), 1-7. doi: [10.1016/j.scitotenv.2019.05.071](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.071)

- Jespersen, S. N., & Østergaard L. (2012). The roles of cerebral blood flow, capillary transit time heterogeneity, and oxygen tension in brain oxygenation and metabolism. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(2), 264-277. doi: [10.1038/jcbfm.2011.153](https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.153)
- Jin, Y., Lu, L., Tu, W., Luo, T. & Fu, Z. (2019). Impacts of polystyrene microplastic on the barrier, microbiota and metabolism of mice. *Science of the total environment*, 649, 308-317. doi: [10.1016/j.scitotenv.2018.08.353](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.353)
- Jung, B. K., Han, S. W., Park, S. H., Bae, J. S., Choi, J., & Ryu, K.Y. (2020). Neurotoxic potential of polystyrene nanoplastics in primary cells originating from mouse brain. *Neurotoxicology*, 81, 189-196. doi: [10.1016/j.neuro.2020.10.008](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.10.008)
- Kasar, P., Sharma, D. K., & Ahmaruzzaman, M. (2020). Thermal and catalytic decomposition of waste plastics and its co-processing with petroleum residue through pyrolysis process. *Journal of Cleaner Production*, 265(121639), 1-25. doi: [10.1016/j.jclepro.2020.121639](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121639)
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332–349. doi: [10.1002/fft2.44](https://doi.org/10.1002/fft2.44)
- Khan, H., Yerramilli, A. S., D'Oliveira, A., Alford, T. L., Boffito, D. C., & Patience, G. S. (2020). Experimental methods in chemical engineering: X-ray diffraction spectroscopy—XRD. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 98, 1255–1266. doi: [10.1002/cjce.23747](https://doi.org/10.1002/cjce.23747)
- Khan, S. A., Khan, S. B., Khan, L. U., Farooq, A., Akhtar, K., & Asiri, A. M. (2018). *Handbook of materials characterization*. Springer (2nd Ed.). https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-92955-2_9
- Klaine, S. J., Koelmans A. A., Horne, N., Carley, S., Handy, R. D., Kapustka, L., Nowack, B., & von der Kammer F. (2012). Paradigms to assess the environmental impact of manufactured materials. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(1), 3-14. doi: [10.1002/etc.733](https://doi.org/10.1002/etc.733)
- Klempová, S., Oravec, M., & Vizárová K. (2023). Analysis of thermally and UV-Vis aged plasticized PVC using UV-Vis, ATR-FTIR and Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 294, 1-11. doi: [10.1016/j.saa.2023.122541](https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.122541)
- Koelmas, A. A., Gouin, T., Thompson, R., Wallace, N., & Arthur, C. (2014). Plastics in the marine environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(1), 5-10. doi: [10.1002/etc.2426](https://doi.org/10.1002/etc.2426)
- Koelmans, A. A., Redondo, P. E., Nor, N. H. M., de Ruijter, V. N., Mintenig, S. M., & Kooi, M. (2022). Risk assessment of microplastic particles. *Nature reviews. Materials*, 7(2), 138–52. doi: [10.1038/s41578-021-00411-y](https://doi.org/10.1038/s41578-021-00411-y)
- Law, K. L. (2017). Plastics in the Marine Environment. *The Annual Review of Marine Science*, 9(1), 205-229. doi: [10.1146/annurev-marine-010816-060409](https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010816-060409)
- Lehner, R., Weder, C., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser B. (2019). Emergence of nanoplastic in the environment and possible impact on human health. *Environmental science & Technology*, 53(4), 1748-1765. doi: [10.1021/acs.est.8b05512](https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05512)
- Leslie, H. A., van Velzen, M. J. M., Brandsma, S. H., Vethaak, A. D., García-Vallejo, J. J., & Lamoree M.H. (2022). Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment*

International, 163, 1-8. doi: [10.1016/j.envint.2022.107199](https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199)

- Li W., Zu B., Yang Q., Guo J., & Li J. (2023). Sources, distribution, and environmental effects of microplastics: a systematic review. *RSC Advances*, 13(23), 15566-15574. doi: [10.1039/d3ra02169f](https://doi.org/10.1039/d3ra02169f)
- Li, X., He, E., Xia, B., Liu, Y., Zhang, P., Cao, X., Zhao, L., Xu, X., & Qiu, H. (2021). Protein corona-induced aggregation of differently sized nanoplastics: impacts of protein type and concentration. *Environmental Science: Nano*, 8(6), 1560-1570. doi: [10.1039/D1EN00115A](https://doi.org/10.1039/D1EN00115A)
- Lichota J., Skjørringe, T., Thomsen, L. B., & Moos T. (2010). Macromolecular drug transport into the brain using targeted therapy. *Journal of Neurochemistry*, 113(1), 1-13. doi: [10.1111/j.1471-4159.2009.06544.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06544.x)
- Lichtman, J., & Conchello, J.A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2, 910–919. doi: [10.1038/nmeth817](https://doi.org/10.1038/nmeth817)
- Lim, S. L., Ng, C. T., Zou, L., Lu, Y., Chen, J., Bay, B. H., Shen, H. M., Ong, C. N. (2019). Targeted metabolomics reveals differential biological effects of nanoplastics and nanoZnO in human lung cells. *Nanotoxicology*, 13(8), 1117–1132. doi: [10.1016/j.chemosphere.2019.01.056](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.056)
- López-Macay, A., Fernández-Torres, J., & Zepeda, A. (2016). Principios y aplicaciones de la microscopía láser confocal en la investigación biomédica. *Investigación en Discapacidad*, 5(3), 156-164. <http://www.medigraphic.com/rid>
- Luissint, A. C., Artus, C., Glacial, F., Ganeshamoorthy, K., & Couraud P. O. (2012). Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS*, 9(23), 1-12. doi: [10.1186/2045-8118-9-23](https://doi.org/10.1186/2045-8118-9-23)
- Lunov, O., Syrovets, T., Loos, C., Beil, J., Delacher, M., Tron, K., Nienhaus, U., Musyanovych, A., Mailander, V., Landfester, K., & Simmet, T. (2011). Differential Uptake of Functionalized Polystyrene Nanoparticles by Human Macrophages and a Monocytic Cell Line. *ACS Nano*, 5(3), 1657–1669. doi: [10.1021/nn2000756](https://doi.org/10.1021/nn2000756)
- Magrí, D., Sánchez-Moreno, P., Caputo, G., Gatto F., Veronesi, M., Bardi, G., Catelani, T., Guarnieri, D., Athanassiou, A., Pompa, P. P., & Fragouli, D. (2018). Laser Ablation as a Versatile Tool To Mimic Polyethylene Terephthalate Nanoplastic Pollutants: Characterization and Toxicology Assessment. *ACS Nano*, 12(8), 7690-7700. doi: [10.1021/acsnano.8b01331](https://doi.org/10.1021/acsnano.8b01331)
- Mahadevan, G., & Valiyaveetil, S. (2021). Comparison of Genotoxicity and Cytotoxicity of Polyvinyl Chloride and Poly (methyl methacrylate) Nanoparticles on Normal Human Lung Cell. *Chemical Research in Toxicology*, 34(6), 1468-1480. doi: [10.1021/acs.chemrestox.0c00391](https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00391)
- Malacara, D. (2004). Óptica básica. Fondo de Cultura Económica. Recuperado el 2 de diciembre del 2024. <https://fondodeculturaeconomica.com/Ficha/9786071634139/F>
- Mandarino, L. J., Sundarraj, N., Finlayson, J., & Hassell, H. R. (1993). Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Experimental Eye Research*, 57(5), 609-621. doi: [10.1006/exer.1993.1166](https://doi.org/10.1006/exer.1993.1166)
- Mathiisen, T. M., Lehre, K. P., Danbolt, N. C., & Ottersen, O. P. (2010). The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D

- reconstruction. *Glia*, 58(9), 1094–1103. doi: [10.1002/glia.20990](https://doi.org/10.1002/glia.20990)
- McCluskey, C., Quinn, J. P., & McGrath J. W. (2005). An evaluation of three new-generation tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity in activated sludge microorganisms. *Microbial Ecology* 49(3), 379-387. doi: [10.1007/s00248-004-0012-z](https://doi.org/10.1007/s00248-004-0012-z)
- Meseguer–Valdenebro, J. L., Portoles A., & Martínez–Conesa, E. (2020). Revisión de los principales tipos de elastómeros y ensayos normalizados. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 21(2), 75-95. <https://reviberpol.org/2020/03/01/revision-de-los-principales-tipos-de-elastomeros-y-ensayos-normalizados/>
- Meyers, N., Catarino A. I., Declercq A. M., Brenan A., Devriese L., Vandegehuchte, M., De White, B., Janssen C., & Everaet, G. (2022). Microplastic detection and identification by Nile red staining: Towards a semi-automated, cost- and time-effective technique. *Science of The Total Environment*, 823(153441), 1-12. doi: [10.1016/j.scitotenv.2022.153441](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153441)
- Mikol., V., Hirsch, E., & Giegé B. R. (1990). Diagnostic of precipitant for biomacromolecule crystallization by quasielastic light-scattering. *Journal of Molecular Biology*, 213(1), 187-195. doi: [10.1016/S0022-2836\(05\)80130-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80130-5)
- Milojkovic Kerklaan, B., van Tellingen, O., Huitema, A., Beijnen, J., Boogerd, W., Schellens, J., & Brandsma, D. (2016). Strategies to target drugs to gliomas and CNS metastases of solid tumors. *Journal of Neurology*, 263(3), 428-440. doi: [10.1007/s00415-015-7919-9](https://doi.org/10.1007/s00415-015-7919-9)
- Monika, M., Mahto, S. K., Das, S., Ranjan, A., Singh, S. K., Roy, P., & Misra, N. (2015). Chemical modification of poly (vinyl chloride) for blood and cellular biocompatibility. *RSC Advances*, 5(56), 45231–45238. doi: [10.1039/c5ra03362d](https://doi.org/10.1039/c5ra03362d)
- Monti, D. M., Guarnieri, D., Napolitano, G., Piccoli, R., Netti, P., Fusco, S., & Arciello, A. (2015). Biocompatibility, uptake and endocytosis pathways of polystyrene nanoparticles in primary human renal epithelial cells. *Journal of Biotechnology*, 193, 3-10. doi: [10.1016/j.jbiotec.2014.11.004](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.11.004)
- Montiel-Eulefi, E., Barrientos Díaz, L., Leal, P., Roa, J. C., Risopatrón, J. Salazar, L. A, Romero, F., & Sánchez R. 2011. Pericytes: New Approaches in Regenerative Therapy, Cerebrovascular Pathology and Cancer. *International Journal of Morphology*, 29(3), 769-781. doi: [10.4067/S0717-95022011000300017](https://doi.org/10.4067/S0717-95022011000300017)
- Mudau, M., Genis, A., Lochner, A., & Strijdom, H. (2012). Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovascular Journal of Africa*, 23(4), 222-231. doi: [10.5830/CVJA-2011-068](https://doi.org/10.5830/CVJA-2011-068)
- Mundoplastic. (2022). La producción mundial de plásticos creció un 3.8% en el 2017. Recuperado el 10 de noviembre del 2023. <https://mundoplast.com/produccion-mundial-plasticos-2017/>
- Murali, K., Kenesei, K., Li, Y., Demeter, K., Környei, Z., & Madarász, E. (2015). Uptake and bio-reactivity of polystyrene nanoparticles is affected by surface modifications, ageing and LPS adsorption: in vitro studies on neural tissue cells. *Nanoscale*, 7(9), 4199–210. doi: [10.1039/c4nr06849a](https://doi.org/10.1039/c4nr06849a).
- Nasrollahzadeh, M., Atarod, M., Sajjadi, M., Sajadi, S. M., & Issaabadi, Z. (2019). Plant-Mediated Green Synthesis of Nanostructures: Mechanisms, Characterization, and Applications. *Interface Science and Technology*, 28, 1-19. doi: [10.1016/B978-0-12-813586-0.00006-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00006-7)

- Nwaneshiudu, A., Kuschal, C., Sakamoto, F. H., Anderson, R. R., Schwarzenberger, K., & Young, R. C. (2012). Introduction to confocal microscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(12), 1-5. doi: [10.1038/jid.2012.429](https://doi.org/10.1038/jid.2012.429)
- Neumaier, F., Zlatopolskiy, B. D., & Neumaier, B. (2021). Drug Penetration into the Central Nervous System: Pharmacokinetic Concepts and In Vitro Model Systems. *Pharmaceutics*, 13(1542), 1-23. doi: [10.3390/pharmaceutics13101542](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101542)
- Nurlidar, F. (2016). How do I calculate cell viability in MTT assay? Recuperado el 10 de diciembre de 2023). [https://www.researchgate.net/post/How do I calculate cell viability in MTT assay/57ece9165b495262096c8391/citation/download](https://www.researchgate.net/post/How_do_I_calculate_cell_viability_in_MTT_assay/57ece9165b495262096c8391/citation/download).
- Paul, M.B., Stock, V., Cara-Carmona, J., Lisicki, E., Shopova, S., Fressard, V., Braeuning, A., Sieg, H., & Böhmert L. (2020). Micro-and nanoplastics -current state of knowledge with the focus on oral uptake and toxicity. *Nanoscale Advances*, 2(10), 4350-4367. doi: [10.1039/D0NA00539H](https://doi.org/10.1039/D0NA00539H)
- Pandey, M., Joshi, G. M., Mukherjee, A., & Thomas, P. (2016). Electrical properties and thermal degradation of poly (vinyl chloride)/polyvinylidene fluoride/ZnO polymer nanocomposites. *Polymer International*, 65(9), 1098-1106. doi: [10.1002/pi.5161](https://doi.org/10.1002/pi.5161)
- Pérez J. M. G. (2014). La edad de los polímeros un mundo de plásticos [Archivo PDF]. [https://www.researchgate.net/publication/273057579 La Edad de los Polimeros Un mundo de plastico](https://www.researchgate.net/publication/273057579_La_Edad_de_los_Polimeros_Un_mundo_de_plastico)
- 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. doi: [10.1016/j.envpol.2015.12.035](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.035)
- Plastics Europe. (2016). Plastics-the Facts 2016. Plastic Europe Association of Plastics Manufacturers. Recuperado el 10 de noviembre del 2024. <https://www.plasticseurope.org/application/files/4315/1310/4805/plastic-the-fact-2016.pdf>.
- Pollmann, H., Kuzel, H. (1989). Mineralogical Inst of University, Erlang, Germany. ICDD Grant-in Acid. Recuperado el 28 de noviembre del 2023. <https://www.icdd.com/gia-recipients/>
- Prado, F., Carabias, M., Rodríguez, E., y Herrero, H. (2002). Presencia de residuos y contaminantes en leche humana. *Revista Española de Salud Pública*, 76(2), 121-132. Recuperado de https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272002000200007
- Prüst, M., Meijer, J., & Westerink, R. H. S. (2020). The plastic brain: Neurotoxicity of micro- and nanoplastics. *Particle and Fibre Toxicology*, 17(1), 1-16. doi:[10.1186/s12989-020-00358-y](https://doi.org/10.1186/s12989-020-00358-y)
- Purmová J. (2007). Effect of the modification of the polymer-rich phase composition on the formation of structural defects in radical suspension PVC. [Tesis Doctoral, Universidad de Groningen]. [https://pure.rug.nl/ws/portalfiles/portal/2813449/Title and Contents.pdf](https://pure.rug.nl/ws/portalfiles/portal/2813449/Title_and_Contents.pdf)
- Rabek J. F. (1995). Polymer photodegradation: mechanisms and experimental methods. Springer Dordrecht. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-011-1274-1#bibliographic-information>
- Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali O., Papa, F., Rongioletti M. C. A., Baiocco, F., Draghi, S., D'Amore, E., Rinaldo, D., Matta, M., & Giorgini, E. (2021). Plasticenta:

- First evidence of microplastics in human placenta. *Environment International*, 146(106274), 1-8. doi: [10.1016/j.envint.2020.106274](https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106274)
- Ramírez-Hernández, A., Aguilar-Flores, C., & Aparicio-Saguilán, A. (2019). Fingerprint analysis of FTIR spectra of polymers containing vinyl acetate. *Dyna*, 86(209), 198-205. doi: [10.15446/dyna.v86n209.7751](https://doi.org/10.15446/dyna.v86n209.7751)
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*, 12(9), 12347-12360. doi: [10.3390/s120912347](https://doi.org/10.3390/s120912347)
- Reimer, L., & Kohl, H. (2008). *Transmission Electron Microscopy: Physics of Image Formation*. Springer. https://books.google.com.mx/books/about/Transmission_Electron_Microscopy.html?id=O-0nI8hxEpMC&redir_esc=y
- Rey, S. F., Franklin, J., & Rey, S. J. (2021). Microplastic pollution on island beaches, Oahu, Hawai'i. *PLOS ONE*, 16(2), 1-12. doi: [10.1371/journal.pone.0247224](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247224)
- Revel, M., Chatel, A., & Mouneryrac, C. (2018). Micro(nano) plastics: A threat to human health? *Current Opinion in Environmental Science y Health*, 1, 17-23. doi: [10.1016/j.coesh.2017.10.003](https://doi.org/10.1016/j.coesh.2017.10.003)
- Rillig, M. C. (2012). Microplastic in Terrestrial Ecosystems and the Soil? *Environment Science & Technology*, 46(12), 6453-6454. doi: [10.1021/es302011r](https://doi.org/10.1021/es302011r)
- Riss T. L., Moravec R. A., Niles A. L., Duellman S., Benink H.A., Worzella T. J., & Minor L. (2016). Cell Viability Assays. *National Center for Biotechnology Information*, 1, 1-25. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/pdf/Bookshelf_NBK144065.pdf
- Ritchie, H., & Roxer, M. (2018). Plastic Pollution. Published online at Our World InData.org. Recuperado el 10 de noviembre del 2023. <https://ourworldindata.org/plastic-pollution>
- Rodríguez-Hernández, A. G., Muñoz-Tabares, J. A., Aguilar-Guzmán, J. C., & Vázquez- Duhalt, R. (2019). A novel and simple method for polyethylene terephthalate (PET) nanoparticle production. *Environmental Science: Nano*, 6(7), 2031-2036. doi: [10.1039/C9EN00365G](https://doi.org/10.1039/C9EN00365G)
- Rodríguez-Hernández, A. G., Chiodoni, A., Bocchini, S., & Vázquez-Duhalt, R. (2020). 3D printer waste, a new source of nanoplastic pollutants. *Environmental Pollution*, 267(4), 1-9. doi: [10.1016/j.envpol.2020.115609](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115609)
- Rogers, K. (2020). Microplastics/ Definition, Properties & Plastic Pollution. Recuperado del 20 de noviembre del 2023. <https://www.britannica.com/technology/microplastic>
- Rosevelt, C., Los Huertos, M., Garza, C., & Nevins, H. M. (2013). Marine debris in central California: Quantifying type and abundance of beach litter in Monterrey Bay, C.A. *Marine Pollution Bulletin*, 71(1-2), 299-306. doi: [10.1016/j.marpolbul.2013.01.015](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.01.015)
- Royte, E. (2019). El plástico es una amenaza para la salud de los humanos. National Geographic. Recuperado el 15 de noviembre del 2023. https://www.nationalgeographic.com/es/ciencia/grandes-reportajes/es-plastico-amenaza-para-nuestra-salud_12739
- Rubinson, K. A., Rubinson, J. F., Ros, L. L., & Albarrán, Y. M. (2001). *Análisis instrumental*. Prentice Hall. <https://es.scribd.com/document/526513239/Analisis-Instrumental-Kenneth-a-Rubinson>

- Rucker, M., Strobel, O., Vollmar, B., Roesken, F., & Menger, M. D. (2000). Vasomotion in critically perfused muscle protects adjacent tissues from capillary perfusion failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 279(2), H550-H558. doi: [10.1152/ajpheart.2000.279.2.H550](https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.2.H550)
- Sadat-Shojai, M., & Gholam-Reza, B. (2010). Recycling of PVC wastes. *Polymer Degradation and Stability*, 96(2011), 401-415. doi: [10.1016/j.polymdegradstab.2010.12.001](https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.12.001)
- Saloman, E. B., Hubbell, J.H., & Scofield, J. H. (1988). X-ray attenuation cross sections for energies 100 eV to 100 keV and elements Z = 1 to Z = 92. *Atomic Data and Nuclear Data Tables*, 38(1), 1–196. doi: [10.1016/0092-640X\(88\)90044-7](https://doi.org/10.1016/0092-640X(88)90044-7)
- Salvati, A., Aberg, C., dos Santos, T., Varela, J., Pinto, P., Lynch, I., & Dawson, K. A. (2011). Experimental and theoretical comparison of intracellular import of polymeric nanoparticles and small molecules: toward models of uptake kinetics. *Nanomedicine*, 7(6), 818–826. doi: [10.1016/j.nano.2011.03.005](https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.03.005)
- Samaniego, R. (2009). Aplicaciones de la microscopía confocal. *Investigación en Discapacidad*, 8(2), 115-119. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2016/ir163d.pdf>
- Sammon, C., Mura, C., Yarwood, J., Everall, N., Swart, R., & Hodge, D. (1998). FTIR-ATR Studies of the Structure and Dynamics of Water Molecules in Polymeric Matrixes. A Comparison of PET and PVC. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(18), 3402–3411. doi: [10.1021/jp980169n](https://doi.org/10.1021/jp980169n)
- Sanderson, M. J., Smith I., Parker I., & Bootman M.D. (2014). Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor Protocol*, 1(10), 1041-1065. doi: [10.1101/pdb.top071795](https://doi.org/10.1101/pdb.top071795)
- Sangkham, S., Faikhaw, O., Munkong, N., Sakunkoo, P., Arunlertaree, C., Chavali, M., Mousazadeh, M., & Tiwari, A. (2022) A review on microplastics and nanoplastics in the environment: Their occurrence, exposure routes, toxic studies, and potential effects on human health. *Marine Pollution Bulletin*. 181(113832), 1-17. doi: [10.1016/j.marpolbul.2022.113832](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113832)
- Schirinzi, G. F., Pérez-Pomeda, I., Sanchís, J., Rossini, C., Farré, M., & Barceló D. (2017). Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environmental Research*, 159, 579-578. doi: [10.1016/j.envres.2017.08.043](https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.043)
- Schröter L., & Ventura, N. (2022). Nanoplastic Toxicity: Insights and Challenges from Experimental Model Systems. *Nano micro small*, 18(31), 1-20. doi: [10.1002/smll.202201680](https://doi.org/10.1002/smll.202201680)
- Schwabl, P., Köppel, S., Königshofer, P., Bucsecs, 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. doi: [10.7326/M19-0618](https://doi.org/10.7326/M19-0618)
- Suhrhoff, T. J., & Scholz-Böttcher, B. M. (2016). Qualitative impact of salinity, UV radiation and turbulence on leaching of organic plastic additives from four common plastics — A lab experiment. *Marine Pollution Bulletin*, 102(1), 84–94. doi: [10.1016/j.marpolbul.2015.11.054](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.11.054)
- Sieg, H., Kästner, C., Krause, B., Meyer, T., Burel, A., Böhmert, L., Lichtenstein, D., Jungnickel, H., Tentschert, J., Laux, P., Braeuning, A., Estrela-Lopis, I., Gauffre, F., Fessard, V., Meijer, J., Luch, A., Thünemann, A., Lampen, A. (2017). Impact of an Artificial Digestion Procedure on Aluminum-Containing Nanomaterials. *Langmuir*, 33(40), 10726–10735. doi: [10.1021/acs.langmuir.7b02729](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b02729)
- Simon, M., van Alst, N., & Vollertsen, J. (2018). Quantification of microplastic mass and removal rates at

- wastewater treatment plants applying Focal Plane Array (FPA)-based Fourier Transform Infrared (FT-IR) imaging. *Water Research*, 142, 1-9. doi: [10.1016/j.watres.2018.05.019](https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.019)
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2001). *Principios de análisis instrumental*. McGraw-Hill. (6^{ta} Ed.). [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/848438/7276 T 16 S 1 Principios analisis instrumental Skoog 5ta Edici n A 1 .pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/848438/7276_T_16_S_1_Principios_analisis_instrumental_Skoog_5ta_Edici_n_A_1_.pdf)
- Sofroniew, M.V., & Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35. doi: [10.1007/s00401-009-0619-8](https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8)
- Spieß, L., Teichert, G., Schwarzer, R., Behnken, H., & Genzel, C. (2019). *Moderne Röntgenbeugung*. Berlín. *Springer Spektrum*, 1, 325-406. doi: [10.1007/978-3-8348-8232-5](https://doi.org/10.1007/978-3-8348-8232-5)
- Stachowiak, G. W., Batchelor, A. W., & Stachowiak, G. B. (2004). Surface Micrography and Analysis. *Tribology Series*, 44, 165-220. doi:[10.1016/S0167-8922\(04\)80024-5](https://doi.org/10.1016/S0167-8922(04)80024-5)
- Stapleton, P. A. (2021). Microplastic and nanoplastic transfer, accumulation, and toxicity in humans. *Current Opinion in Toxicology*, 28, 62-69. doi: [10.1016/j.cotox.2021.10.00](https://doi.org/10.1016/j.cotox.2021.10.00)
- Stock, V., Laurisch, C., Franke, J., Dönmez, M. H., Voss, L., Böhmert, L., Braeuning, A., & Sieg, H. (2020). Uptake and cellular effects of PE, PP, PET and PVC microplastic particles. *Toxicology in Vitro*, 70, 1-9. doi: [10.1016/j.tiv.2020.105021](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.105021)
- Stuart, B. (2005). *Encyclopedia of Chemical Technology*. Willey (4^{ta} Ed.) <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0471238961>
- Stratman, A. N., Malotte, K. M., Mahan, R. D., Davis, M. J., & Davis, G. E. (2009). Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood*, 114(24), 5091–5101. doi:[10.1182/blood-2009-05-222364](https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-222364)
- Sun, Q., Ren, S. Y., & Ni, H. G. (2020). Incidence of microplastics in personal care products: An appreciable part of plastic pollution. *Science of The Total Environment*, 742(1), 1-39. doi: [10.1016/j.scitotenv.2020.140218](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140218)
- Tanaka, K., Takahashi, Y., Kuramochi, H., Osako, M., Tanaka, S., & Suzuki, G. (2021). Preparation of Nanoscale Particles of Five Major Polymers as Potential Standards for the Study of Nanoplastics. *Small*, 17(49), 1-7. doi: [10.1002/smll.202105781](https://doi.org/10.1002/smll.202105781)
- Tang, C. Y., & Yang Z. (2017) Transmission Electron Microscopy (TEM). *Membrane Characterization*, 145-159. doi: [10.1016/B978-0-444-63776-5.00008-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00008-5)
- Teuten, E. L., Saquing, J. M., Knappe, D. R. U., Barlaz, M. A., Jonsson, S., Bjorn, A., Rowland, S. J., Thompson, R. C., Galloway, T. S., Yamashita R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Hung, P., Seang, T., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M., Akkhavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M., & Takada, H. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2027–2045. doi: [10.1098/rstb.2008.0284](https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0284)
- Thermo Fischer. (2023). Fluorescence Spectra Viewer. Recuperado el 25 de noviembre del 2023. <https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer/#!/>
- Thermo Fischer. (2023). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Recuperado el 25 de noviembre del

2023. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/cell-culture-media/dmem.html>
- Thompson, T. (2022). Plastic pollution: Three problems that a global treaty could solve. Recuperado el 8 de noviembre del 2023. <https://www.nature.com/articles/d41586-022-03835-w>
- Thompson, R. C., Moore, C. J., Vom-Saal, F.S., & Swan, S. H. (2009). Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2153-2166. doi: [10.1098/rstb.2009.0053](https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0053)
- 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. doi: [10.1126/science.1094559](https://doi.org/10.1126/science.1094559)
- Titow, V. W. (1990). PVC plastics properties, processing and applications. Springer. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-011-3834-5>
- Toussaint, B., Raffael, B., Angers-Loustau, A., Gilliland, D., Kestens, V., Petrillo, M., Rio- Echeverria I. M. , & Van den E. G. (2019). Review of micro-and nanoplastic contamination in the food chain. *Food Additives & contaminants: Part A*, 36(5), 639-673. doi: [10.1080/19440049.2019.1583381](https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1583381)
- Tower, D. B., & Young, O. M. (1973). The activities of butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase, the rate of anaerobic glycolysis, and the question of a constant density of glial cells in cerebral cortices of various mammalian species from mouse to whale. *Journal of Neurochemistry*, 20(2), 269-78. doi: [10.1111/j.1471-4159.1973.tb12126.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1973.tb12126.x)
- Ureta, E. (1989). *Estabilizadores térmicos y otros aditivos para PVC*. Limusa
- Varela, J. A., Bexiga, M. G., Åberg, C., Simpson, J. C., & Dawson, K. A. (2012). Quantifying size-dependent interactions between fluorescently labeled polystyrene nanoparticles and mammalian cells. *Journal Nanobiotechnology*, 39(10), 1-6. doi: [10.1186/1477-3155-10-39](https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-39)
- Vasanthkumar, M. S., Bhatia, R., Arya, V. P., Sameera, I., Prasad, V., & Jayanna, H. S. (2014). Characterization, charge transport and magnetic properties of multi-walled carbon nanotube–polyvinyl chloride nanocomposites. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 56, 10-16. doi: [10.1016/j.physe.2013.08.010](https://doi.org/10.1016/j.physe.2013.08.010)
- Velandia Cabra, J. R. (2017). Identificación de polímeros por espectroscopía infrarroja. *Ontare*, 5, 115-140. doi: [10.21158/23823399.v5.n0.2017.2005](https://doi.org/10.21158/23823399.v5.n0.2017.2005)
- Verma R., Vinoda K., Papiredy M., & Gowda A. (2016). Toxic Pollutants from Plastic Waste- A Review. *Procedia Environmental Sciences*, 35(1), 701-708. doi: [10.1016/j.proenv.2016.07.069](https://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.07.069)
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K. H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., & Schué, F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84 (2), 377-410. doi: [10.1351/PAC-REC-10-12-04](https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04)
- Vistica, V. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A., & Boyd M. R. (1991). Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Research*, 51(10), 2515-2520. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2021931/>
- von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., & Köhler, A. (2012). Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental Science*

- & *Technology*, 46(20), 11327-11335. doi: [10.1021/es302332w](https://doi.org/10.1021/es302332w)
- Voronovic, E., Skripka, A., Jarockyte, G., Ger, M., Kuciauskas, D., Kaupinis, A., Valius, M., Rotomskis, R., Vetrone, F., & Karabanovas, V. (2021). Uptake of Upconverting Nanoparticles by Breast Cancer Cells: Surface Coating versus the Protein Corona. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(33), 39076–39087. doi: [10.1021/acscami.1c10618](https://doi.org/10.1021/acscami.1c10618)
- Wang, F., Zhang, M., Sha, W., Wang, Y., Hao, H., Dou, Y., Li, Y. (2020). Sorption Behavior and Mechanisms of Organic Contaminants to Nano and Microplastics. *Molecules*, 25(8):1827. doi: [10.3390/molecules25081827](https://doi.org/10.3390/molecules25081827)
- Wang, Q., Bai, J., Ning, B., Fan, L., Sun, T., Fang, Y., Wu, J., Li, S., Duan, C., Zhang, Y., Liang, J., & Gao, Z. (2020). Effects of bisphenol A and nanoscale and microscale polystyrene plastic exposure on particle uptake and toxicity in human Caco-2 cells. *Chemosphere*, 254, 1- 9. doi: [10.1016/j.chemosphere.2020.126788](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126788)
- Wenguang, M., & la Mantia F. P. (1996). Processing and mechanical properties of recycled PVC and of homopolymer blends with virgin PVC. *Journal of Applied Polymer Science*, 59(5), 759-767. doi: [10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19960131\)59:5<759::AID-APP1>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19960131)59:5<759::AID-APP1>3.0.CO;2-V)
- WHO. (2016).Dioxins and their effects on human health. Recuperado el 26 de noviembre de 2023. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dioxins-and-their-effects-on-human-health>
- Widlansky, M., & Gutlerman, D. (2011). Regulation of endothelial function by mitochondrial reactive oxigen species. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(6), 1517-1530. doi: [10.1089/ars.2010.3642](https://doi.org/10.1089/ars.2010.3642)
- Williams, D. B., & Carter, C. B. (2009). Transmission Electron Microscopy. *A Textbook for Materials Science*, 3-22. doi: [10.1007/978-0-387-76501-3](https://doi.org/10.1007/978-0-387-76501-3)
- Win-Shwe, T.T., & Fujimaki, H. (2011). Nanoparticles and neurotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), 6267–6280. doi: [10.3390/ijms12096267](https://doi.org/10.3390/ijms12096267)
- Winikoff, S. E., Zeh, H. J., DeMarco, R., & Lotze, M. T. (2005). Cytolytic Assays. *Measuring Immunity*, 343–349. doi: [10.1016/B978-012455900-4/50291-9](https://doi.org/10.1016/B978-012455900-4/50291-9)
- Wright, S. L., & Kelly, F.J. (2017). Plastic and human health: a micro issue? *Environmental Science and technology*, 51(12), 6634-6647. doi: [10.1021/acs.est.7b00423](https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00423)
- Wu, B., Wu, X., Liu, S., Wang, Z., Chen, L. (2019). Size-dependent effects of polystyrene microplastics on cytotoxicity and efflux pump inhibition in human Caco-2 cells. *Chemosphere*, 221, 333–341. doi: [10.1016/j.chemosphere.2019.01.056](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.056)
- WWF. (2019). No plastic in nature: Assessing plastic ingestion from nature to people. Recuperado el 24 de noviembre del 2024. https://awsassets.panda.org/downloads/plastic_ingestion_press_singles.pdf
- Xu, L., Nirwane, A., & Yao, Y. (2019). Basement membrane and blood-brain barrier. *Stroke and Vascular Neurology*, 4(2), 78-82. doi: [10.1136/svn-2018-000198](https://doi.org/10.1136/svn-2018-000198)
- Xu, H., Hoet, P. H. M., & Nemery, B. (2002). In vitro toxicity assessment of polyvinyl chloride particles and comparison of six cellular systems. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 65(16),

1141–1159. doi:[10.1080/152873902760125372](https://doi.org/10.1080/152873902760125372)

- Yamak, H. (2013). Emulsion Polymerization: Effects of Polymerization Variables on the Properties of Vinyl Acetate Based Emulsion Polymers. *Polymer Science*, 35-72 doi: [10.5772/51498](https://doi.org/10.5772/51498)
- Yaseen, A. A., Yousif, E., Al-Tikrity, E. T., El-Hiti, G. A., Kariuki, B. M., Ahmed, D. S., & Bufaroosha, M. (2021). FTIR, weight, and surface morphology of poly (vinyl chloride) doped with tin complexes containing aromatic and heterocyclic moieties. *Polymers*, 13(19), 3264. doi: [10.3390/polym13193264](https://doi.org/10.3390/polym13193264)
- Yip, Y. J., Lee, S. S. C., Neo, M. L., Teo, S. L., & Valiyaveettil S. (2022). A comparative investigation of toxicity of three polymer nanoparticles on acorn barnacle (*Amphibalanus amphitrite*). *Science of the Total Environment*, 806, 1-11. doi: [10.1016/j.scitotenv.2021.150965](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150965)
- 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), 1-24. doi: [10.3390/ijerph17051509](https://doi.org/10.3390/ijerph17051509)
- Yu, J., Sun, L., Ma, C., Qiao, Y., & Yao, H. (2015). Thermal degradation of PVC: A review. *Waste Manag*, 48, 300-314. doi: [10.1016/j.wasman.2015.11.041](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.11.041)
- Zhang, H., Sundaresan, S., & Webb, M. A. (2023). Molecular Dynamics Investigation of Nanoscale Hydrophobicity of Polymer Surfaces: What Makes Water Wet? *The Journal of Physical Chemistry B*, 127(22), 5115–5127. doi:
- Zhang, Na., Li, Y. B., He, H. R., Zhang, J. F., & 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(12), 1-7. doi: [10.1016/j.scitotenv.2020.144345](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144345)
- Zhang, H., & Hackam, R. (1999). Electrical surface resistance, hydrophobicity and diffusion phenomena in PVC. *IEEE transactions on dielectrics and electrical insulation*, 6(1), 73-83. doi: [10.1109/94.752013](https://doi.org/10.1109/94.752013)
- Zhoua, Y., Peng, Z., Seven, E. S., & Leblanc, R. M. (2018). Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 28(270), 290-303. doi: [10.1016/j.jconrel.2017.12.015](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.12.015)

Anexos

Anexo A

Tabla 8 . Parámetros cristalográficos del carbonato de calcio. Recuperado Pollmann y Kuzel, 1989; ICDD,1941.

No.	h	k	l	d [Å]	2θ [°]	I [%]
1	0	1	2	3.8600	23.022	12.0
2	1	0	4	3.03500	29.406	100.0
3	0	0	6	2.84500	31.418	3.0
4	1	1	0	2.49500	35.966	14.0
5	1	1	3	2.28500	39.402	18.0
6	2	0	2	2.09500	43.146	18.0
7	0	2	4	1.92700	47.124	5.0
8	0	1	8	1.91300	47.490	17.0
9	1	1	6	1.87500	48.514	17.0
10	2	1	1	1.62600	56.555	4.0
11	1	2	2	1.60400	57.402	8.0
12	1	0	10	1.58700	58.075	2.0
13	2	1	4	1.52500	60.678	5.0
14	2	0	8	1.51800	60.987	4.0
15	1	1	9	1.51000	61.345	3.0
16	1	2	5	1.47300	63.060	2.0
17	3	0	0	1.44000	64.678	5.0
18	0	0	12	1.42200	65.599	3.0
19	2	1	7	1.35600	69.231	1.0
20	0	2	10	1.33900	70.238	2.0
21	1	2	8	1.29700	72.870	2.0
22	3	0	6	1.28400	73.729	1.0
23	2	2	0	1.24700	76.300	1.0
24	1	1	12	1.23500	77.177	2.0
25	3	1	2	1.18690	80.933	1.0
26	2	1	10	1.17950	81.547	3.0
27	0	1	14	1.17280	82.113	1.0
28	1	3	4	1.15380	83.767	3.0
29	2	2	6	1.14250	84.788	1.0
30	1	2	11	1.12440	86.483	1.0
31	2	0	14	1.06130	93.072	1.0
32	4	0	4	1.04730	94.701	3.0
33	3	1	8	1.04470	95.011	4.0
34	1	0	16	1.03520	96.165	2.0
35	2	1	13	1.02340	97.647	1.0
36	3	0	12	1.01180	99.161	2.0

37	3	2	1	0.98950	102.242	1.0
38	2	3	2	0.98460	102.952	1.0
39	1	3	10	0.97820	103.899	1.0
40	1	2	14	0.97670	104.124	3.0
41	3	2	4	0.96550	105.846	2.0
42	0	4	8	0.96360	106.145	4.0
43	0	2	16	0.95620	107.334	1.0
44	4	1	0	0.94290	109.561	2.0
45	2	2	12	0.93760	110.484	2.0

Tabla 9 . Parámetros cristalográficos del sulfato de calcio hidratado. Recuperado Pollmann y Kuzel, 1989; ICDD,1941.

No.	h	k	l	d [Å]	2θ [°]	I [%]
1	2	0	0	6.01277	14.721	80.0
2	-2	0	2	4.37084	20.301	5.0
3	-2	1	1	4.27910	20.741	5.0
4	-1	0	3	3.99376	22.241	5.0
5	-3	0	1	3.82575	23.231	5.0
6	0	1	3	3.61137	24.631	5.0
7	0	2	0	3.46737	25.671	50.0
8	-1	2	1	3.21998	27.682	5.0
9	0	2	2	3.04248	29.332	10.0
10	4	0	0	3.00640	29.692	100.00
11	2	0	4	2.80298	31.902	90.0
12	4	0	2	2.71522	32.962	10.0
13	1	2	3	2.6511	34.262	5.0
14	3	2	1	2.56931	34.892	5.0
15	0	2	4	2.34098	38.422	5.0
16	4	2	0	2.27114	39.652	5.0
17	3	2	3	2.22700	40.472	5.0
18	-2	2	4	2.18212	41.342	5.0
19	4	2	2	2.13720	42.253	10.0
20	0	0	6	2.11524	42.713	10.0
21	0	3	3	2.02817	44.643	5.0
22	3	3	0	2.00181	45.263	5.0
23	-5	2	1	1.95326	46.453	5.0
24	6	0	2	1.90834	47.613	10.0
25	-4	2	4	1.84892	49.243	20.0
26	4	2	4	1.84470	49.363	30.0
27	4	3	1	1.81275	50.293	5.0
28	5	2	3	1.78884	51.013	5.0
29	6	1	3	1.75113	52.193	5.0
30	6	2	0	1.73538	52.703	10.0
31	0	4	0	1.73294	52.783	10.0
32	-1	4	1	1.69954	53.904	5.0
33	6	0	4	1.69258	54.143	20.0

34	2	4	0	1.66534	55.103	20.0
35	-2	4	2	1.61089	57.134	5.0
36	-3	4	1	1.57835	58.424	5.0
37	4	2	6	1.54589	59.774	5.0
38	1	1	8	1.53287	60.334	5.0
39	6	2	4	1.52078	60.864	5.0
0	4	4	0	1.50120	61.744	5.0
41	-7	1	4	1.47797	62.824	5.0
42	2	4	4	1.47397	63.014	10.0
43	-3	3	6	1.45516	63.924	5.0
44	-3	1	8	1.44427	64.464	5.0
45	3	1	8	1.44128	64.614	5.0
46	-6	3	3	1.42693	65.344	5.0
47	-5	4	1	1.39795	66.874	5.0
48	-8	0	4	1.36059	68.965	5.0
49	6	4	0	1.31091	71.975	10.0
50	4	2	8	1.29907	72.735	10.0
51	8	2	4	1.26370	75.115	10.0
52	3	3	8	1.24265	76.615	10.0
53	7	4	1	1.21403	78.766	5.0
54	10	0	2	1.18095	79.996	5.0
55	10	0	2	1.18095	81.426	5.0
56	6	2	8	1.16903	82.435	5.0
57	9	3	0	1.15697	83.486	5.0

Anexos B

La figura 36 se muestran las distribuciones de tamaños de las diferentes concentraciones 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1 mg/mL en agua desionizada. Sin embargo, en la figura 37 y 38 A, se observan las distribuciones de tamaños del medio DMEM y en la figura 37 y 38 B el DMEM suplementado (10% SFB, 1% antibiótico-antimicótico y 1% del suplemento de los factores de crecimiento endotelial y de pericitos).

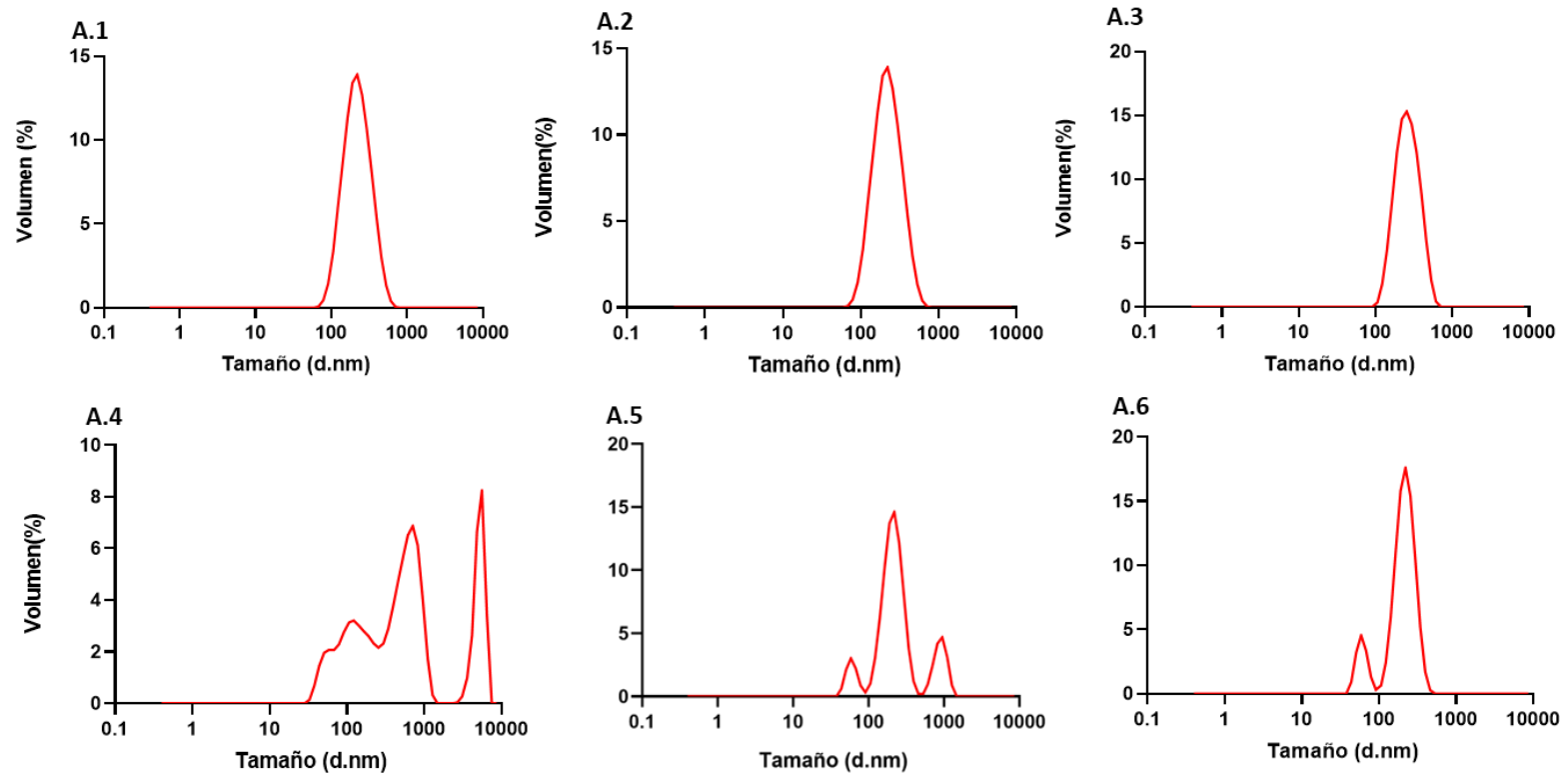


Figura 36. Distribuciones de tamaños y potenciales zetas en H₂O desionizada obtenidos mediante DLS. A.1 Concentración 10 ng, A.2 Concentración 100ng, A.3 Concentración 100 µg, A.4 Concentración 10 µg, A.5 Concentración 1 µg, A.6 y Concentración 1 mg.

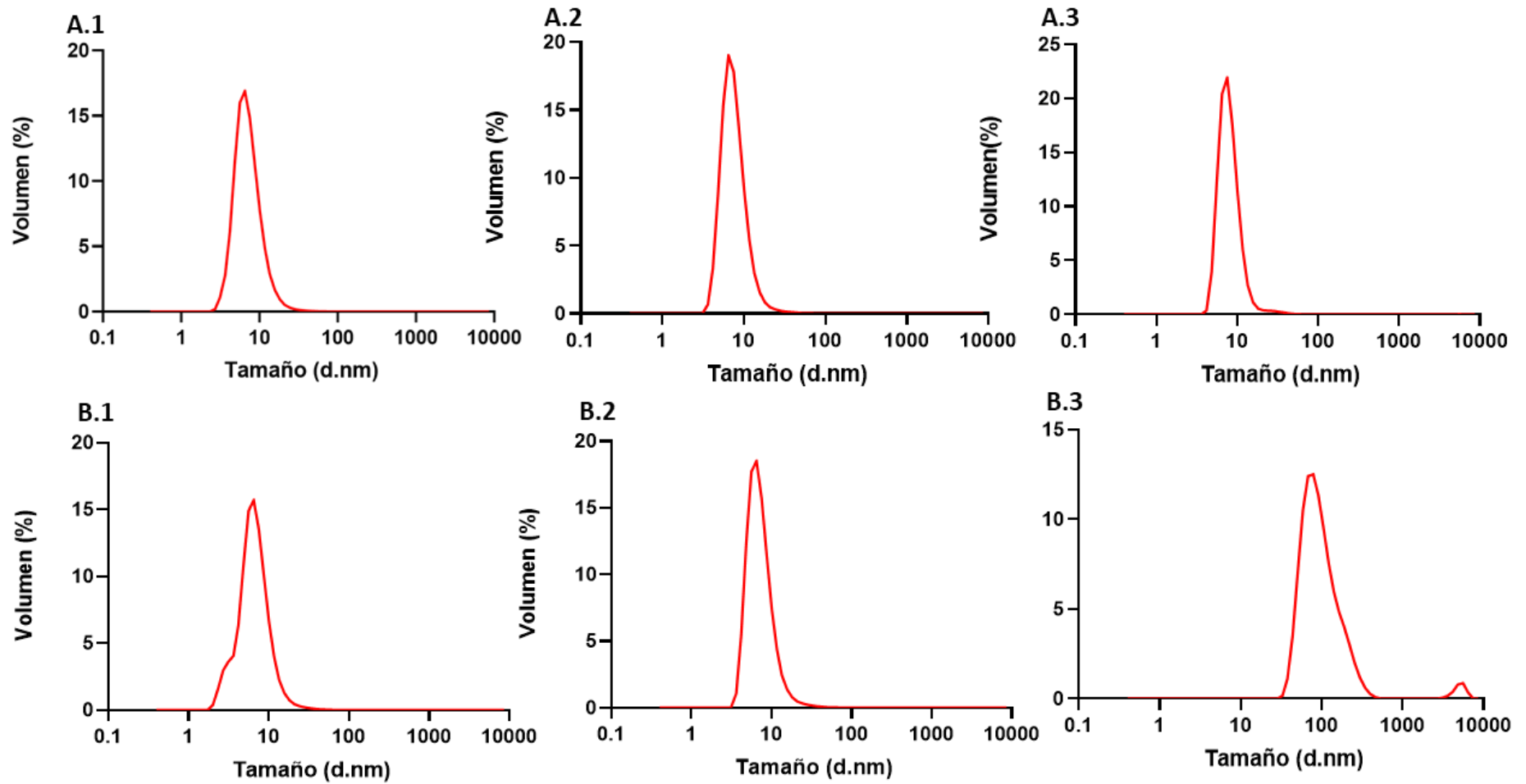


Figura 37. Distribuciones de tamaños de las NPs de PVC de sus respectivas concentraciones mediante DLS. A) Se representa la distribución de los tamaños en DMEM y B) DMEM suplementado. Es importante mencionar que las concentraciones corresponden A.1) 10 ng, A.2) 100ng y A.3) 100 μ g.

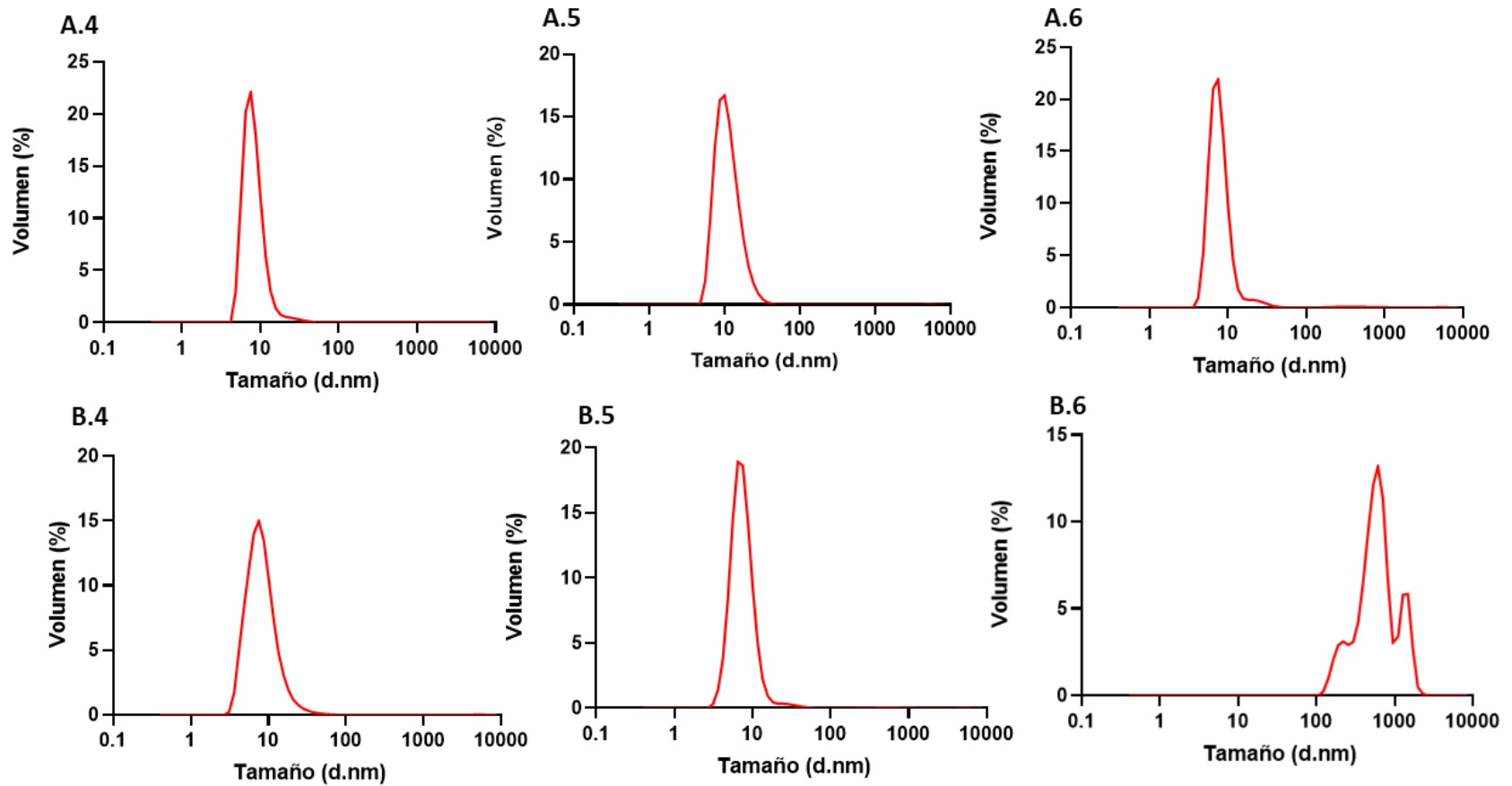


Figura 38. Distribuciones de tamaños de las NPs de PVC de sus respectivas concentraciones mediante DLS. A) Se representa la distribución de los tamaños en DMEM y B) DMEM suplementado. Es importante mencionar que las concentraciones corresponden A.4) 10 μ g, A.5) 1 μ g y A.6) 1 mg.