



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

EFECTO DE LOS MICROPLÁSTICOS DE POLIESTIRENO SOBRE
EL CITOESQUELETO DE CÉLULAS DE PULMÓN HUMANAS.

Tesis que presenta:

Noemí Iraís Pat Vázquez

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS (MATERIALES POLIMÉRICOS)

Mérida, Yucatán, México

2023

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, éstos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Firma: _____

Noemí Iraís Pat Vázquez

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN MATERIALES POLIMÉRICOS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Noemí Iraís Pat Vázquez titulado “**Efecto de los microplásticos de poliestireno sobre el citoesqueleto de células de pulmón humanas**” fue realizado en la Unidad de Materiales, Laboratorio de Biomateriales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes y la codirección del Dr. José Manuel Cervantes Uc, pertenecientes al Programa de Posgrado en Materiales Poliméricos de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 03 de febrero de 2023

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con número de CVU 1076361, para la realización de este proyecto de investigación.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) por las facilidades otorgadas, y por el uso de sus instalaciones y equipos.

Al laboratorio de Biomateriales de la Unidad de Materiales del CICY para la realización y desarrollo del proyecto.

Al Laboratorio Biología del Citoesqueleto y Virología de la Facultad de Medicina, UNAM, por brindarme la posibilidad de usar sus instalaciones y equipos, para poder realizar experimentos correspondientes para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes, por otorgarme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por la confianza, enseñanzas y conocimientos que me siempre me brindó, las palabras de ánimo, paciencia y por enseñarme la fortaleza que no sabía que tenía, por todas las atenciones brindadas ante situaciones adversas que finalmente vencimos; muchas gracias por todas estas gratas experiencias y por hacerme crecer personal y profesionalmente, es un honor, sin duda fueron los mejores años.

Al Dr. José Manuel Cervantes Uc, por todas las enseñanzas y conocimientos que me compartió, por la amabilidad para aclarar mis dudas, por el apoyo a lo largo de este proyecto de investigación, y sobre todo por brindarme su tiempo para mejorar profesionalmente.

A la Dra. Rocío Gabriela Tirado Mendoza, por formar parte de mi comité revisor, y por recibirme en su laboratorio para poder desarrollar experimentos en el Laboratorio Biología del Citoesqueleto y Virología de la Facultad de Medicina de la UNAM en la Ciudad de México; estoy muy agradecida por todo el apoyo, amabilidad, preocupación y atención que me brindó durante toda mi estancia ya que nunca me sentí sola. Gracias por sus conocimientos y paciencia, sin duda fue la mejor experiencia, aprendí mucho.

Al Dr. Ricardo Herbé Cruz Estrada, muchas gracias por sus conocimientos, revisiones, comentarios y tiempo para ayudarme a mejorar en cada etapa de la elaboración de este proyecto.

Al Dr. Gilberto Acosta González, gracias por compartirme sus conocimientos, sus consejos para mejorar, sus revisiones y todos los aprendizajes que me brindó.

A la Dra. Ana Rodríguez Hernández, por ayudarme a mejorar con sus revisiones, tiempo y conocimientos.

Al amable apoyo del personal técnico del CICY, especialmente al Dr. Alejandro May Pat por ayudarme a caracterizar y obtener las imágenes del Microscopio de Fuerza Atómica (AFM), gracias por la paciencia y por compartirme su conocimiento; de igual manera, agradezco a la M.C. Ángela Kú González, por ayudarme a la caracterización y obtención de las imágenes del microscopio confocal, por compartirme su conocimiento, disposición y tiempo.

A mis amigos y compañeros del laboratorio que siempre confían en mí, por su apoyo y sus ánimos, Ing. Cielo Poot, Ing. Vanessa Pat, Ing. José Luis Quijano, Biol. Jaime Domínguez y M. C. Ileana León.

A la M.C. Mariana López y a Laura Chávez por ayudarme a realizar los experimentos en el laboratorio de la UNAM, por su paciencia y atenciones, gracias por brindarme amablemente su tiempo y sus conocimientos; así mismo, a la médico Zaira Camacho por compartirme sus experiencias y enseñanzas, así como todas sus atenciones durante mi estancia en la Ciudad de México.

A la maestra Aurora Fuentes, a la nutrióloga Bárbara Rodríguez y a la bióloga Fernanda Rodríguez, por sus atenciones durante mi estancia en la Ciudad de México.

A los maestros Paulina Varguez, Alejandra Sanguino, Carlos Belman, Cynthia Xool y Antonio Abreu por compartirme sus conocimientos.

A mis padres Armín Pat y Noemí Vázquez, por acompañarme sin importar cualquier adversidad, por apoyarme y creer en mí, en cualesquiera que sean mis decisiones.

A mi hermano Fabián Pat que siempre me hace ver lo poderosa y guerrera que soy, porque siempre me enseña que rendirse no es una opción.

A Paola Pech, por ayudarme a mejorar como persona, por la paciencia, y por ayudarme a ser fuerte.

DEDICATORIA

A mi abuela Lidia Agar García Interián.

Donde quiera que te encuentres, sé que estás orgullosa de mí.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	3
1.1. <i>Polímeros sintéticos</i>	3
1.1.1. <i>Producción, usos y aplicaciones</i>	3
1.2. <i>Poliestireno (PS)</i>	4
1.2.1. <i>Propiedades</i>	4
1.2.2. <i>Aplicaciones</i>	5
1.2.3. <i>Degradación ambiental del PS</i>	6
1.3. <i>Microplásticos (MPs)</i>	7
1.3.1. <i>Definición</i>	7
1.3.2. <i>Tipos y generación de MPs</i>	7
1.3.3. <i>Impacto en los seres vivos</i>	8
1.3.3.1. <i>Implicación ecológica</i>	8
1.3.3.2. <i>Impacto en la salud humana</i>	11
1.3.3.3. <i>Impacto en células</i>	13
1.4. <i>Citoesqueleto</i>	14
1.4.1. <i>Microfilamentos</i>	15
1.4.2. <i>Microtúbulos</i>	15

1.4.3. <i>Filamentos intermedios</i>	16
1.5. <i>Efecto de los MPs de PS sobre el citoesqueleto</i>	16
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA	20
2.1. Determinación de las características topográficas de los MPs de PS	20
2.2. Evaluación del efecto de los MPs de PS sobre los componentes del citoesqueleto	20
2.2.1. Cultivo de células alveolares humanas	20
2.2.2. Evaluación de los componentes del citoesqueleto de células alveolares humanas en presencia de los MPs de PS.	22
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
3.1. Características topográficas de los MPs de PS	24
3.2. Efectos de los MPs de PS sobre componentes del citoesqueleto de las células alveolares humanas	27
CONCLUSIONES	46
PERSPECTIVAS	47
REFERENCIAS	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1 Propiedades del PS de uso general.....	5
Tabla 1.2 Principales aplicaciones y características del PS de uso general y HIPS.	6
Tabla 1.3 Principales efectos biológicos derivados de los MPs.....	9
Tabla 1.4 Tipos de exposición de MPs y sus efectos.	12

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura química del PS.....	4
Figura 1.2 MPs según su origen.....	8
Figura 1.3 Esquema de los tipos de exposición de los MPs al ser humano	11
Figura 1.4 Principales estructuras que componen el citoesqueleto	14
Figura 1.5 Estructura y longitud de los componentes presentes en el citoesqueleto de la célula. .	16
Figura 2.1 Cámaras de cultivo de 8 celdas con células A549	22
Figura 3.1 Imágenes AFM representativas de MPs de PS.	25
Figura 3.2 Microscopia confocal de los MPs de PS.....	26
Figura 3.3 Efecto de los MPs de PS sobre la actina a 24 horas de exposición.	29
Figura 3.4 Efecto de los MPs de PS sobre la actina a 48 horas de exposición.	30
Figura 3.5 Efecto de los MPs de PS sobre la actina a 72 horas de exposición.	31
Figura 3.6 Efecto de los MPs de PS sobre la anexina a 24 horas de exposición.	33
Figura 3.7 Efecto de los MPs de PS sobre la anexina a 48 horas de exposición.	34
Figura 3.8 Efecto de los MPs de PS sobre la anexina a 72 horas de exposición.	35
Figura 3.9 Efecto de los MPs de PS sobre la tubulina a 24 horas de exposición.....	36
Figura 3.10 Efecto de los MPs de PS sobre la tubulina a 48 horas de exposición.....	37
Figura 3.11 Efecto de los MPs de PS sobre la tubulina a 72 horas de exposición.....	38
Figura 3.12 Efecto de los MPs de PS sobre la vimentina a 24 horas de exposición.	40
Figura 3.13 Efecto de los MPs de PS sobre la vimentina a 48 horas de exposición.....	41
Figura 3.14 Efecto de los MPs de PS sobre la vimentina a 72 horas de exposición.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM	Microscopia de Fuerza Atómica
ABC	Transportadores dependientes de ATP
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de Suero Bovino
DAPI	Diamidino-2-fenilindol
DMEM	Powdered Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GPa	Gigapascal
HDPE	Polietileno de Alta Densidad
HIPS	Poliestireno de Alto Impacto
LDPE	Polietileno de Baja Densidad
LLDPE	Polietileno de Baja Densidad Lineal
MPs	Microplásticos
MPa	Megapascal
NPs	Nanoplásticos
PBS	Búffer Fosfato Salino
PE	Polietileno
PET	Poli (Tereftalato de Etileno)
PFA	Paraformaldehído
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PVC	Poli (Cloruro de Vinilo)
SFB	Suero Fetal Bovino
Tg	Temperatura de Transición Vítrea

RESUMEN

Los microplásticos de poliestireno (MPs-PS) son partículas con dimensiones menores a 5 mm, que se han encontrado dispersos en los ecosistemas acuáticos, aéreos y terrestres en virtud de que este polímero (PS) es uno de los más utilizados en la fabricación de materiales de un solo uso, por lo que, al finalizar su vida útil, suele clasificarse como desecho dando lugar a los microplásticos (MPs). Dichas partículas afectan a numerosos organismos ya que pueden modificar diversos procesos celulares, metabólicos y genómicos. Sin embargo, a pesar de la modificación de dichos procesos, el mecanismo de ingreso a las células no se ha sido estudiado en su totalidad.

Bajo este panorama, el presente trabajo se centró en evaluar el efecto de los MPs-PS sobre el citoesqueleto de las células de pulmón humano A549, debido a que el citoesqueleto es la estructura celular capaz de reaccionar ante cualquier estímulo externo, permitir su entrada y promover respuestas celulares específicas. Para abordar este objetivo, MPs-PS fluorescentes de 1 μm de diámetro se caracterizaron por Microscopia de Fuerza Atómica (AFM) y Microscopia Confocal, para posteriormente evaluar el efecto que producen sobre diversos componentes del citoesqueleto, como la anexina, vimentina, actina y tubulina mediante inmunocitoquímica a tres tiempos de exposición: 24, 48 y 72 h y con tres concentraciones: 10, 100, 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Los resultados demostraron que la exposición de las células pulmonares humanas a MPs-PS, promueven cambios en la morfología y en la organización del citoesqueleto, dependiendo de la dosis y el tiempo (los mayores cambios se observaron al máximo tiempo y concentración analizados). La reorganización del citoesqueleto por la presencia de los MPs-PS consistió en estiramiento de las fibras de actina; además se mostraron acortadas, astilladas y desordenadas. La anexina pudo determinar la existencia de muerte celular al observar fragmentación de los núcleos y expresar una máxima intensidad fluorescente en las células afectadas. La tubulina se mostró difusa resaltando cambios que pudieron determinar la separación del contacto célula-célula, y la vimentina determinó, en conjunto con la actina, los cambios morfológicos de la célula. De manera interesante, se observó que los MPs-PS se acumulan principalmente en las zonas perinucleares de la célula.

Estos hallazgos sugieren que el citoesqueleto es un factor importante para que la acumulación a nivel celular de los MPs-PS se lleve a cabo, por lo que su estudio es vital para entender el mecanismo de ingreso y permanencia de estas partículas en las células.

ABSTRACT

Polystyrene microplastics (MPs-PS) are particles with dimensions less than 5 mm, which have been found spread in aquatic, aerial and terrestrial ecosystems as the Polystyrene (PS) is one of the most widely used polymers in the manufacturing of single-use materials, which, at the end of its useful life, is usually classified as waste, giving rise to microplastics (MPs), affecting various organisms, as they can modify diverse cellular, metabolic and genomic processes. Despite of this, the mechanism of entry to cells has not been fully understood.

Under this scenery, this work focused on evaluating the effect of MPs-PS on the cytoskeleton of human lung cells A549, as the cytoskeleton is the cellular structure capable of reacting to any external stimulus, allowing its entry and promoting specific cellular responses. To address this objective, fluorescent MPs-PS of 1 μm in diameter were characterized by Atomic Force Microscopy (AFM) and Confocal Microscopy, then the effect of microparticles on various components of the cytoskeleton such as annexin, vimentin, actin and tubulin was evaluated by immunocytochemistry at three exposure times: 24, 48 and 72 h, and at three concentrations: 10, 100, 1000 $\mu\text{g/mL}$.

The results showed that the exposure of human lung cells to MPs-PS promotes changes in the morphology and organization of the cytoskeleton in a dose- and time-dependent manner, the greatest changes were observed at the maximum time and concentration analyzed. The reorganization of the cytoskeleton due to the presence of the MPs-PS consisted of stretching the actin fibers; they appeared shortened, splintered and disordered. Annexin was able to determine the existence of cell death by observing nuclei fragmentation and expressing a maximum fluorescent intensity in the affected cells; tubulin was diffuse, highlighting changes that could determine the cell-cell contact separation, and vimentin determined, in together with actin, the morphological changes of the cell. Interestingly, MPs-PS were found to accumulate mainly in the perinuclear areas of the cell.

These findings suggest that the cytoskeleton is an important factor for the accumulation of MPs-PS at the cellular level, so its study is vital to understand the mechanism of entry and permanence of these particles in cells.

INTRODUCCIÓN

Los plásticos son materiales poliméricos que poseen una alta masa molecular y plasticidad; generalmente éstos son obtenidos de fuentes petroquímicas [1]. Debido a su gran durabilidad y maleabilidad, se ha extendido su uso en la fabricación de diversos productos de embalaje, textiles, materiales de limpieza y cosméticos [2], incluso sus aplicaciones se extienden a la generación de dispositivos biomédicos y a campos como la agricultura y la electrónica. Sin embargo, los beneficios que aportan los plásticos a la humanidad se ven mermados por la escasa cultura del reciclaje y la deficiente disposición final de los plásticos cuando éstos ya han terminado con su vida útil, generando fragmentos pequeños, denominados microplásticos (MPs) [3].

Los MPs son fragmentos o partículas con una dimensión inferior a los 5 mm de diámetro [4], los cuales pueden clasificarse de acuerdo a su origen, de tal manera que, los que provienen de la degradación de plásticos mayores son considerados MPs secundarios, mientras que los diseñados desde su origen como micropartículas, como por ejemplo la diamantina y algunos aditivos cosméticos, son denominados MPs primarios [5].

Actualmente se ha comprobado que los polímeros plásticos que generan más MPs son el polipropileno (PP), el polietileno (PE) y el poliestireno (PS); éstos generan partículas que rondan diámetros de entre 1 a 5 μm y habitualmente con morfología esférica [6-10]. Estos polímeros plásticos son conocidos como polímeros básicos o “commodities” ya que se producen en volúmenes grandes y generalmente se usan en aplicaciones domésticas [11].

El PS es uno de los plásticos que es empleado, en la mayoría de los casos, para productos de un solo uso, por lo que es uno de los polímeros más abundantes, debido a su versatilidad y amplia gama de aplicaciones y propiedades como su rigidez y alta durabilidad. Sin embargo, al ser un polímero plástico sumamente usado, al finalizar su vida útil, ya no se considera un producto valioso y es clasificado como desecho [9, 12].

Algunos autores reportan que los desechos plásticos del PS experimentan deterioro en tiraderos de basura, lo que eventualmente genera MPs secundarios que contaminan el suelo, el agua e incluso en el aire, ya que debido a su tamaño y a su masa relativamente baja pueden persistir en los ecosistemas acuáticos, terrestres y aéreos por mucho tiempo. En particular, los MPs aéreos, persisten suspendidos en la atmósfera, aumentando la posibilidad de ser inhalados por los organismos, por lo que son considerados como un riesgo para la salud humana [13, 14]. Sin

embargo, a pesar de que se reporta la existencia de los MPs en el aire, los efectos de estas partículas en el ser humano, no se han estudiado lo suficiente.

Investigaciones recientes sobre la presencia de MPs en el aire revelaron que los MPs con un diámetro $< 10 \mu\text{m}$ representan un riesgo para la salud humana debido a que, por su tamaño, son inhalados y se acumulan en el interior de la cavidad nasal. En contraste, los MPs con diámetros menores, que rondan los $\leq 2.5 \mu\text{m}$, representan mayor riesgo para el sistema respiratorio y cardiovascular, puesto que sus dimensiones les permiten alojarse en la vía nasofaríngea e incluso ingresar y acumularse a los alveolos pulmonares, ya que este tamaño de partícula no es retenido por la mucosa de la cavidad nasal. Por otro lado, se ha demostrado que las partículas atmosféricas que tienen un diámetro $\geq 10 \mu\text{m}$, pueden alojarse en las regiones intratorácicas del sistema respiratorio [5, 15], ocasionando efectos negativos en las células alveolares, como daños en el ADN [16], estrés oxidativo e inflamación [17], y bioacumulación celular, lo que promueve una desregulación de diversos procesos celulares, probablemente a través de su interacción con el citoesqueleto [18].

El citoesqueleto es un complejo tridimensional de proteínas, el cual, además de proveer soporte a los organelos celulares, también participa en diversos procesos celulares como el transporte de sustancias, la división, la proliferación, la adhesión, la diferenciación e incluso participa en procesos como la muerte celular (mediante la reorganización de la red de microtúbulos apoptóticos); todo ello en respuesta a estímulos externos como los eléctricos, magnéticos, físicos, químicos y mecánicos. En este sentido, el citoesqueleto es una red celular extensa y dinámica que organiza y modifica su estructura para que la célula pueda adaptarse a su entorno, e incluso alejarse de estímulos citotóxicos, por lo que es posible relacionar los cambios en la expresión y reordenamiento de los componentes del citoesqueleto con los procesos celulares atóxicos o citotóxicos que experimentan las células al estar en contacto con diferentes materiales [19-22].

Bajo este panorama, este trabajo se centra en estudiar *in vitro* el efecto de los MPs de PS en el citoesqueleto de la línea celular A549 derivadas del sistema respiratorio, descritas como células epiteliales alveolares humanas tipo II, con la finalidad de contribuir al entendimiento de los mecanismos de contacto de los MPs con células pulmonares, y su posible relación con la tolerancia a largo plazo que han exhibido estas micropartículas en diversos tejidos, lo que a su vez permitirá vislumbrar los potenciales efectos de los MPs en la salud humana.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1. *Polímeros sintéticos*

Los polímeros son macromoléculas que se forman por la unión de una o varias moléculas mediante enlaces covalentes; dependiendo de cuál sea su origen, pueden ser clasificados como naturales o sintéticos. Los polímeros naturales como el ADN, la celulosa o proteínas presentan estructuras complejas y son llamados también biopolímeros, mientras que los sintéticos, generalmente se obtienen artificialmente en laboratorios o en la industria y se producen con una amplia gama de pesos moleculares y a gran escala, por lo que son de mayor interés comercial [23]. Estos últimos son generalmente derivados del petróleo y contienen enlaces carbono-carbono en su cadena, específicamente en su columna vertebral. Aunque en la actualidad se usan polímeros sintéticos en muchas aplicaciones de la vida diaria [24], éstos se han producido aproximadamente desde hace 70 años y, gracias a sus propiedades y aplicaciones han podido sustituir gran parte de los materiales utilizados por la humanidad [25]. Debido a su versatilidad y a su bajo costo, los polímeros se pueden usar en todos los sectores industriales como la construcción, agricultura, deporte, equipo médico, etc. [26].

1.1.1. *Producción, usos y aplicaciones*

La producción de los polímeros sintéticos comenzó en el siglo XX con el primero de ellos, la baquelita; posteriormente la producción en masa de estos polímeros se logró hasta el año 1950 alcanzando desde entonces un crecimiento exponencial. Esto ha ocurrido gracias al descubrimiento de polímeros como el poli (tereftalato de etileno) (PET), polietileno de alta, baja y lineal de baja densidad (HDPE, LDPE y LLDPE), poli (cloruro de vinilo) (PVC), polipropileno (PP) y poliestireno (PS); estos materiales son llamados también polímeros “commodities” o básicos y hoy en día se fabrican miles de éstos a escala comercial. La mayoría de los polímeros sintéticos se producen con petroquímicos no renovables, los cuales, aunque son económicos, tienen propiedades físicas que se ajustan cuando se sintetizan y pueden ser moldeados mediante procesos como el rotomoldeo, la inyección, extrusión, compresión, soplado o termoformado [27].

Las aplicaciones de los polímeros son extensas y están presentes en todos los ámbitos de la vida cotidiana. En la actualidad, los polímeros sintéticos se han utilizado en productos manufacturados logrando sustituir los materiales usados tradicionalmente como la madera, metales y materiales cerámicos [28, 29]. Estos polímeros están inmersos en diversas áreas, incluso se ha optimizado su

producción para aplicaciones biomédicas y farmacobiológicas, logrando su uso en dispositivos quirúrgicos y de diagnóstico, en la ingeniería de tejidos, en la medicina regenerativa, e incluso han sido usados en sistemas de administración de fármacos [30].

1.2. *Poliestireno (PS)*

El PS es un polímero sintético, inodoro e incoloro; es considerado un termoplástico aromático que proviene de la polimerización del estireno, el cual es considerado uno de los monómeros más versátiles, ya que tiene la capacidad de copolimerizarse con otros monómeros. Se obtiene mediante polimerización por radicales libres, usando iniciadores como el peróxido de benzoilo [31]. Su estructura química, se encuentra representada en la Figura 1.1.

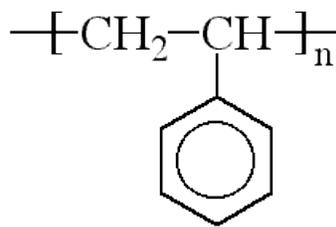


Figura 1.1 Estructura química del PS.

La presencia del anillo de benceno, en uno de cada dos átomos de carbono de su cadena principal, le otorga una configuración voluminosa rígida. Este polímero generalmente es transparente y también puede ser espumado. Existen cuatro tipos principales [32-34]:

- PS cristal de uso común, sólido transparente, duro y frágil.
- PS de Alto Impacto (HIPS), más resistente a golpes súbitos y opaco.
- PS expandido, el cual es ligero y contiene una especie de burbujas lo que reduce su densidad.
- PS extrusionado, con propiedades similares al PS expandido, pero con celdas cerradas.

1.2.1. *Propiedades*

El PS de uso de general es un material frágil y, debido a sus propiedades y bajo costo es utilizado en un sinnúmero de materiales; además, su producción es relativamente fácil. Tiene una densidad entre 1.04 y 1.06 g/cm³ y se caracteriza por su rigidez. Su temperatura de transición vítrea se encuentra entre 90 y 95 °C, lo que lo hace adecuado para su procesamiento por moldeo o inyección, obteniéndose objetos de pared muy delgada; presenta propiedades como su resistencia mecánica, aislamiento térmico y estabilidad dimensional [35]. Dispone de propiedades eléctricas como un

factor de potencia muy bajo y gran resistividad volumétrica; dichas propiedades no son afectadas por la humedad del ambiente. Es soluble en disolventes orgánicos como cetonas, ésteres e hidrocarburos aromáticos.; es resistente a ácidos, álcalis, sales, aceites minerales, ácidos orgánicos y alcoholes [31, 36, 37]. Las propiedades del PS, se encuentran en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1 Propiedades del PS de uso general

Propiedad	Unidades	PS de uso general
Densidad	kg/m ³	1.05
Índice de refracción		1.589
Temperatura de transición vítrea (Tg)	°C	90-95
Esfuerzo de tensión	MPa	40
Módulo de flexión	GPa	3
Resistencia al impacto	J/m	20-50

1.2.2. Aplicaciones

El PS tiene diversas aplicaciones, como por ejemplo, en la industria del embalaje, la construcción, muebles, artículos para el hogar, electricidad, electrónica, transporte y en la agricultura [36, 37]. Con frecuencia se producen con este polímero productos transparentes como artículos de laboratorio y envases para alimentos. La presentación espumada es un excelente aislante térmico por lo que es usado en techos, paredes de edificios y artículos como refrigeradores y congeladores [9]. El PS se usa principalmente para material de laboratorio, equipos de diagnóstico y componentes de dispositivos electrónicos; las principales aplicaciones del PS y del HIPS se encuentran resumidas en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2 Principales aplicaciones y características del PS de uso general y HIPS.

Aplicación	Propiedades y características	Tipo
Material de laboratorio y diagnóstico, placas de Petri, tubos de ensayo, componentes de cultivo de tejidos, matraces, bandejas, pipetas.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Transparencia ✓ Resistencia química ✓ Rigidez 	PS de uso general
Carcasas para equipos de diagnóstico	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Tenacidad ✓ Estabilidad dimensional 	HIPS

1.2.3. Degradación ambiental del PS

La degradación de un polímero en condiciones ambientales depende de ciertos factores como el pH, la temperatura y la humedad, e incluso los microorganismos que se encuentren en el entorno, ya que éstos pueden acelerar el proceso degradativo; por último, pero no menos importante, son las propiedades y características del polímero en cuestión [33].

La degradación del PS es lenta, y se requieren de 10 a 1000 años [38] para esto, gracias a sus propiedades hidrofóbicas, por lo que se encuentra por tiempos prolongados en el medio ambiente como residuo, lo que contribuye a su fácil dispersión en los ecosistemas.

Además de lo anterior, factores abióticos como la radiación UV y la temperatura también contribuyen a la degradación del polímero [39]; la naturaleza involucra la degradación abiótica que puede ser foto o térmica, y ésta es seguida por una degradación biótica [40]. El calor, el agua y humedad desempeñan un rol importante para que el proceso de degradación se lleve a cabo, el incremento de la temperatura por rayos UV en tiempos prolongados inducen termooxidación y fotooxidación de los polímeros plásticos; dichos procesos involucran moléculas de oxígeno, por lo que este hecho favorece el ambiente para el crecimiento de microorganismo que finalmente degradan el material. El pH es otro factor que podría provocar la fragmentación de la superficie

[41]. Es importante mencionar que todos estos factores desencadenan factores bióticos mismos que conducen a una degradación del material.

Recientemente se ha reportado que cepas como la *Pseudomonas aeruginosa* NB26, *Rhodococcus ruber*, *Pseudomonas putida* CA-3, *Curvularia*, *Bacillus cereus*, *Xanthomonas* sp., *Sphingobacterium* sp., *Microbacterium* sp. NA23, *Paenibacillus urinalis* NA26, *Bacillus* sp. NB6, participan en la biodegradación del PS [37]. Aunque el proceso biodegradativo aún no es develado por completo, se sabe que éste inicia en el momento en el cual las bacterias comienzan a crecer sobre la superficie del polímero formando biopelículas y liberando enzimas degradativas sobre el PS, promoviendo pérdida de masa, de acuerdo a estudios termogravimétricos [37, 39, 42].

1.3. Microplásticos (MPs)

1.3.1. Definición

Los MPs son partículas pequeñas de un tamaño que no sobrepasan los 5 mm, por lo que se encuentran con facilidad en diferentes lugares del medio ambiente, agua, suelo y aire. Estas partículas tienen diferentes formas: esferas, fragmentos y fibras [43].

1.3.2. Tipos y generación de MPs

Estas partículas son clasificadas según su origen, existiendo fundamentalmente dos tipos de MPs: los primarios y los secundarios. Los MPs primarios son aquellos que son fabricados desde su origen con un tamaño micrométrico, por lo que ingresan al medio ambiente como micropartículas; ejemplo de ello son las partículas contenidas en productos cosméticos y pastas dentales [44, 45]. Los MPs secundarios se producen por la desintegración de los plásticos de mayor tamaño a consecuencia de efectos físicos, químicos o mecánicos que degradan los plásticos de gran tamaño [45]. Debido a su tamaño micrométrico, tanto los MPs primarios como secundarios pueden esparcirse con facilidad. La Figura se en la Figura 1.2 muestra los diferentes tipos de MPs que existen, según su origen. Los MPs más comunes encontrados en el medio ambiente son principalmente aquellos derivados de polímeros como el PE, PP, PS, PVC y varios poliésteres [46].

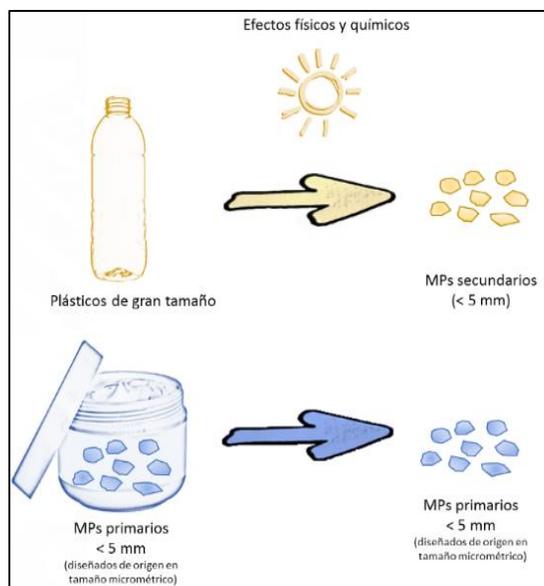


Figura 1.2 Clasificación de los MP según su origen. Los MP secundarios se producen gracias al efecto de factores físicos y químicos como la radiación UV, mientras que los primarios son diseñados desde su origen con tamaño micrométrico. (Elaboración propia).

A pesar de que los MP son un problema de contaminación, resulta imposible eliminar completamente toda esta contaminación plástica, así como eliminar completamente el uso de plásticos, pues tienen propiedades y usos para aplicaciones importantes en todos los sectores de la industria. Actualmente, se están investigando estrategias para mitigar o revertir de alguna manera este problema que, con el paso de los años, se ha ido incrementado. Inicialmente se ha hablado de campañas de concientización a la población para el uso razonable de los plásticos, así como actividades de limpieza y reutilización-reciclaje, acciones para reducir productos plásticos de un solo uso, entre otras; cabe mencionar que se necesita que las industrias se involucren en conjunto con la población para poder llevar a cabo estas propuestas [10], y que las acciones para aminorar la generación de desechos plásticos se acompañen de políticas públicas regulatorias [47, 48].

1.3.3. Impacto en los seres vivos

1.3.3.1. Implicación ecológica

Los MP afectan seriamente la salud animal. Los peces son la especie con más ingesta de dichas partículas, puesto que estos animales los confunden con su alimento [36]. Actualmente se ha comprobado que la ingesta de MP produce principalmente obstrucción de los apéndices alimentarios y del sistema digestivo, así como inflamación y laceración de los tejidos

gastrointestinales, lo cual impide la absorción de nutrientes y limita otros procesos como la reproducción de los organismos [45].

A pesar de que el impacto ecológico se da con mayor frecuencia en la vida acuática, los MPs pueden influir en las propiedades del suelo ya que procesos como la degradación de la hojarasca y cambios en ciclos de nutrientes pueden resultar perjudicados [49]. Los principales efectos de los MPs sobre los seres vivos se resumen en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3 Principales efectos biológicos derivados de los MPs.

Organismo de estudio	Tejido estudiado	MP analizado	Hallazgo	Referencia
Microbiota de ratón (Mamífero)	Membrana intestinal	Poliestireno <5 μm	<ul style="list-style-type: none"> • Desorden metabólico • Disbiosis 	[50]
Erizo de mar	Larva de <i>Paracentrotus lividus</i>	Policloruro de vinilo <250 μm $\leq 20 \mu\text{m}$	Bloqueo en la primera etapa del desarrollo de la larva	[51]
Pez cebra	Larva de pez cebra	Poliestireno 5 μm 50 μm	<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones en el microbioma de la larva del pez cebra. • Alteraciones en genes relacionados con el metabolismo energético. 	[52]
Artrópodo terrestre	Tracto intestinal de	Poliétileno <500 μm	Desequilibrio en microbiota	[53]

	<i>Folsomia candida</i>			
Pez	Línea celular de pez RTL-W1	MPs marinos (polietileno de baja y alta densidad, polipropileno, poliestireno)	Citotoxicidad	[54]
Ratón	Barrera encefálica	Poliestireno 0.2, 2 y 10 μm	Acumulación de MPs de PS	[55]
Ratón	Superficie ocular	Poliestireno de 2 μm	Aparición de MPs en citoplasma de células oculares y pérdida de viabilidad (<i>in vitro</i>). Ojo seco e inflamación ocular (<i>in vivo</i>).	[56]
Artemia partenogenética	Células epiteliales de intestino	Poliestireno 10 μm	Afectaciones en la microvellosidad intestinal	[57]
Ser humano	Placenta	Polipropileno	Presencia de MPs en las placentas humanas	[58]
Ser humano	Línea celular cerebral y epitelial humana T98G, HeLa	Polietileno y poliestireno	Inducción de estrés oxidativo	[59]

1.3.3.2. Impacto en la salud humana

Durante los últimos años, las investigaciones sobre los MPs han tratado de esclarecer los efectos que éstos producen en la salud humana, y al estar distribuidos en diversos ambientes como fragmentos, fibras y películas es posible que sus efectos ocurran de maneras distintas. Además de contener aditivos químicos, su exposición al medio ambiente facilita la formación de biopelículas microbianas, que vuelven a los MPs fuentes de agentes patógenos [54].

La Figura 1.3 muestra las tres formas de exposición a los MPs que existen, las cuales afectan de manera diferente a los seres vivos. La exposición puede ocurrir mediante contacto directo (tópico), inhalación e ingesta, siendo esta última, la vía de acceso más estudiada de los MPs al organismo. Por otro lado, la exposición por inhalación ocurre debido a la gran facilidad que tienen los MPs de poder transportarse por el aire, puesto que el tamaño de los MPs aéreos suele ser menor que las partículas encontradas en el suelo o en el agua [46].

Aunque se ha documentado que el ambiente exterior posee un gran número de estas micropartículas, también se han realizado investigaciones que comprueban la existencia de MPs en ambientes internos como los hogares y oficinas [35, 60].

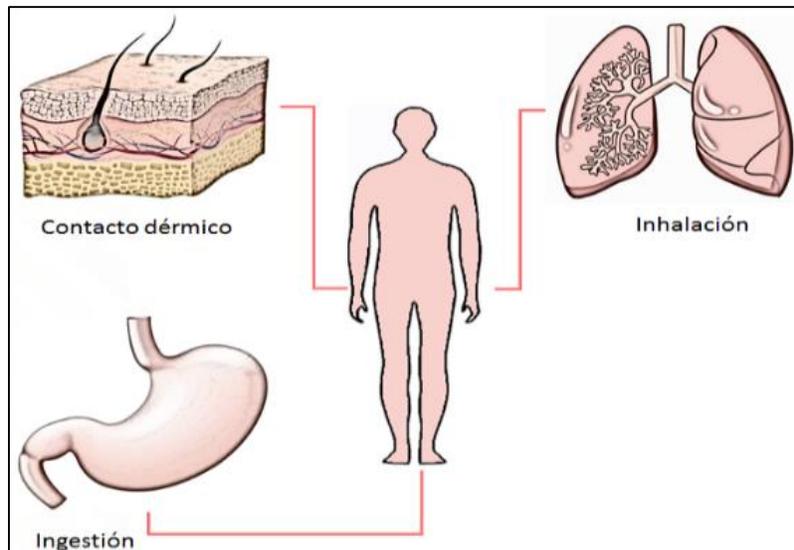


Figura 1.3 Esquema de los tipos de exposición de los MPs al ser humano: inhalación, ingestión y contacto dérmico.

La Tabla 1.4 muestra los tipos de exposición las cuales se dan a través de 3 vías, rutas en las cuales estas partículas siguen para llegar al organismo en diferentes formas; así como el medio de ingreso

al organismo de los MPs, ya que a través del consumo y uso de los elementos expuestos en la tabla es posible el ingreso de dichas partículas al organismo; en ella se puede notar que los principales efectos de los MPs adquiridos por inhalación están asociados a afecciones pulmonares.

Tabla 1.4 Tipos de exposición de MPs y sus efectos.

Tipo de exposición	Medio de ingreso al organismo	Efectos	Referencia
Ingestión	<ul style="list-style-type: none"> • Ingesta de alimentos • Consumo de agua 	<ul style="list-style-type: none"> • Afecta principalmente el sistema gastrointestinal. 	[46, 61]
Exposición dérmica	<ul style="list-style-type: none"> • Productos de higiene personal: jabones, cremas con exfoliantes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Envejecimiento de la piel. • Manchas oscuras. 	[46]
Inhalación	<ul style="list-style-type: none"> • La principal vía es a través de las fosas nasales. • Erosión del suelo que contiene MPs 	<ul style="list-style-type: none"> • Afecciones principalmente en pulmones. • Epitelio respiratorio. • Efecto directo de las vías respiratorias superiores. 	[46, 62, 63]

Actualmente existe un importante vacío de información sobre la evaluación de la interacción de MPs con mamíferos, sus mecanismos de acción, y posibles efectos en la salud. Aunado a esto, es importante señalar que se han detectado MPs en productos de consumo humano, como por ejemplo, mariscos [64], azúcar [65], sal de mar [66], cerveza [67] y agua de grifo [55].

La mayoría de las investigaciones sobre los MPs se centran en su efecto ecológico y muy poco se ha estudiado sobre los efectos que pueden causar a la salud humana. Sin embargo, existe evidencia de que los MPs pueden transportarse en el medio ambiente, así como entrar y salir de nuestro cuerpo; también son capaces de desarrollar problemas en el sistema respiratorio, hepático e inmune, así como alteraciones en el sistema gastrointestinal [68].

De manera particular, el PS es un polímero que tiene un alto impacto y que induce problemas en la reproducción de organismos marinos como las ostras, afectando su ciclo de vida e impactando de

manera negativa en la perpetuación de la especie y provocando un desequilibrio en los ecosistemas [69].

Bajo este panorama, y pese a los numerosos estudios sobre la presencia de los MPs en los seres vivos, aún no se ha esclarecido si esta bioacumulación de estas micropartículas es reversible o si existen estrategias de eliminación de MPs, por lo que diagnosticar su presencia y determinar sus efectos es la primera etapa para atender esta problemática.

1.3.3.3. *Impacto en células*

La literatura reporta que los MPs de 4.7 μm que son absorbidos mediante inhalación inducen en las células estrés oxidativo, necrosis, apoptosis, disminución de la proliferación, entre otros. Estudios recientes con modelos *in vitro* de exposición a MPs y nanoplasticos (NPs) de PS, han demostrado el impacto de estas partículas en la expresión de proteínas transportadoras dependientes de ATP ABC, (del inglés ATP-binding cassette), las cuales son las encargadas de convertir energía en movimiento, fuera y dentro del citoplasma [16, 70].

Estudios realizados por Lee *et al.* [71], enfocados en evaluar la citotoxicidad de MPs de PS de diferentes tamaños (0.5, 1 y 5 μm) en células endoteliales de vena umbilical humana a diferentes tiempos de exposición (0, 24, 48 y 72 horas) y a diferentes concentraciones (0, 20, 40, 60, 80, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$), demostraron que la pérdida de viabilidad celular está en función de la dosis, del tamaño de la partícula, y del tiempo de exposición; los MPs de 0.5 y 1 μm , a los mayores tiempos de exposición y, en concentraciones entre 20 y 100 $\mu\text{g/mL}$, disminuyeron la viabilidad celular. Adicionalmente, este estudio demostró que MPs de PS de 0.5 y 1 μm de diámetro, pero no los de 5 μm , produjeron la formación de estructuras tubulares (indicativas de la funcionalidad especializada de células endoteliales), lo que indica que la afectación de la funcionalidad de las células endoteliales es dependiente del tamaño de los MPs de PS.

Por otro lado, Wang, *et al.* [72], demostraron que existe una relación entre el tamaño de los MPs de PS y su internalización a las células de cáncer de colon humano, ya que los MPs de menor tamaño (300 y 500 nm) presentaron las tasas de absorción altas (73 y 71% respectivamente), mientras que los MPs de mayor tamaño (1 μm , 3 μm , y 6 μm) mostraron las menores tasas de absorción (49, 43 y 30% respectivamente). Asimismo, se demostró que en las células ocurrió un cambio de morfología y adhesión a la superficie tras 24 horas de exposición, pues mostraron una forma redondeada y

retracción de proyecciones citoplasmáticas, en comparación con las células no expuestas a MPs, las cuales se mostraban alargadas; estos cambios podrían estar regulados por el citoesqueleto y sus proteínas participantes, pues la forma de la célula y sus funciones dinámicas y mecánicas, se encuentran mediadas principalmente por este complejo.

1.4. Citoesqueleto

El citoesqueleto es una red de fibras, compuesta por proteínas, que representan el esqueleto de las células animales; tiene múltiples funciones y responde a estímulos ambientales y señales físicas. Está involucrado en diversos procesos celulares como la división celular, transporte intracelular, endocitosis, transmisión de fuerzas, adhesión y adaptación de la forma celular, así como en el proceso de mecanotransducción [73, 74].

Las proteínas principales que conforman al citoesqueleto son la actina, una proteína que conforma los microfilamentos, y la tubulina que se encuentra en los microtúbulos, tal y como se muestra en la Figura 1.4, mientras que las proteínas que conforman principalmente los filamentos intermedios son la vimentina, queratina, desmina, fibras neuronales y fibras gliales; cada una con una función y estructura diferente [73, 75, 76].

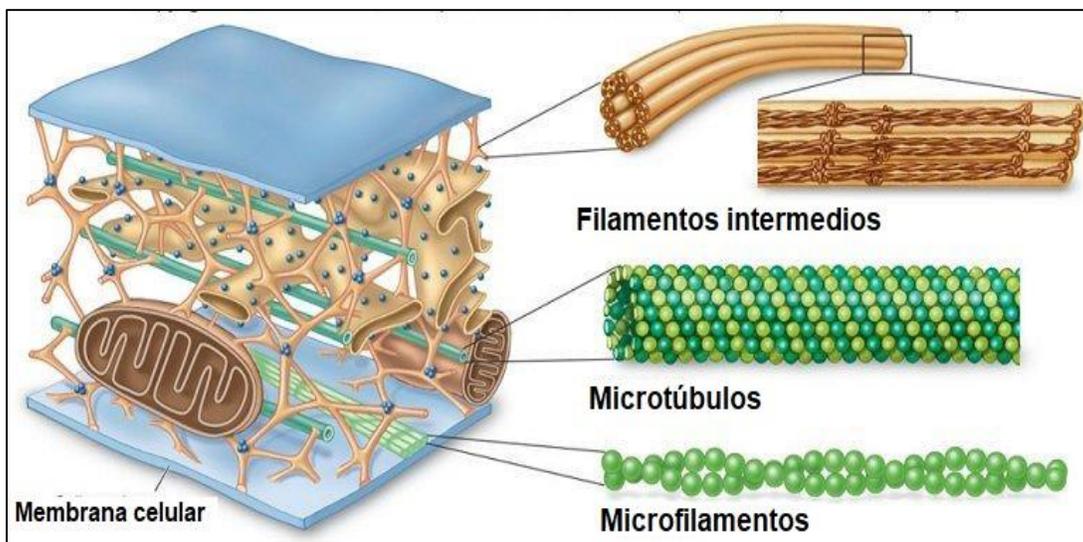


Figura 1.4 Principales estructuras que componen el citoesqueleto: Filamentos intermedios, microtúbulos y microfilamentos.

1.4.1. *Microfilamentos*

La función principal de la actina que se encuentran en los microfilamentos es generar fuerzas para realizar el movimiento celular focal, la adhesión y cambios de forma de las células, por lo que a la actina se le conoce por ser la proteína del citoesqueleto que tiene un trabajo más dinámico en comparación con otras proteínas presentes; tiene una estructura monomérica y filamentosa, y es el componente principal del citoesqueleto. Los filamentos de actina miden aproximadamente de 7 a 9 nm y son de carácter semiflexible, lo que le permite mantener una función dinámica; debido a esto, pueden reaccionar ante diversos estímulos, mismos que determinan la morfología de la célula [75].

Los microfilamentos son capaces de originar las fibras de estrés que proporciona resistencia a las células en diversas fuerzas de cizallamiento; de igual manera, participa en otros procesos como división citoplasmática, movimiento de los organelos y la fluidez de la membrana plasmática [73].

1.4.2. *Microtúbulos*

Estas estructuras son huecas, no ramificadas, miden entre 24 y 26 nm de diámetro, tal y como se muestra en la Figura 1.5, su proteína principal es la tubulina. Los microtúbulos pueden encontrarse en el citoplasma o estar presentes en cilios y flagelos. Realizan una función mecánica y, al igual que con los microfilamentos, las células logran su forma gracias a estos microtúbulos, tienen la capacidad de ensamblarse con otras proteínas. Están formados principalmente por heterodímeros helicoidales enrollados para formar sus paredes [73, 75]. Asimismo, durante la mitosis, proceso en el cual la célula se divide para producir dos células hijas, los microtúbulos cumplen una función importante al ser los encargados de organizar el huso mitótico, participando de esta manera en la movilidad y segregación del material genético [75, 77].

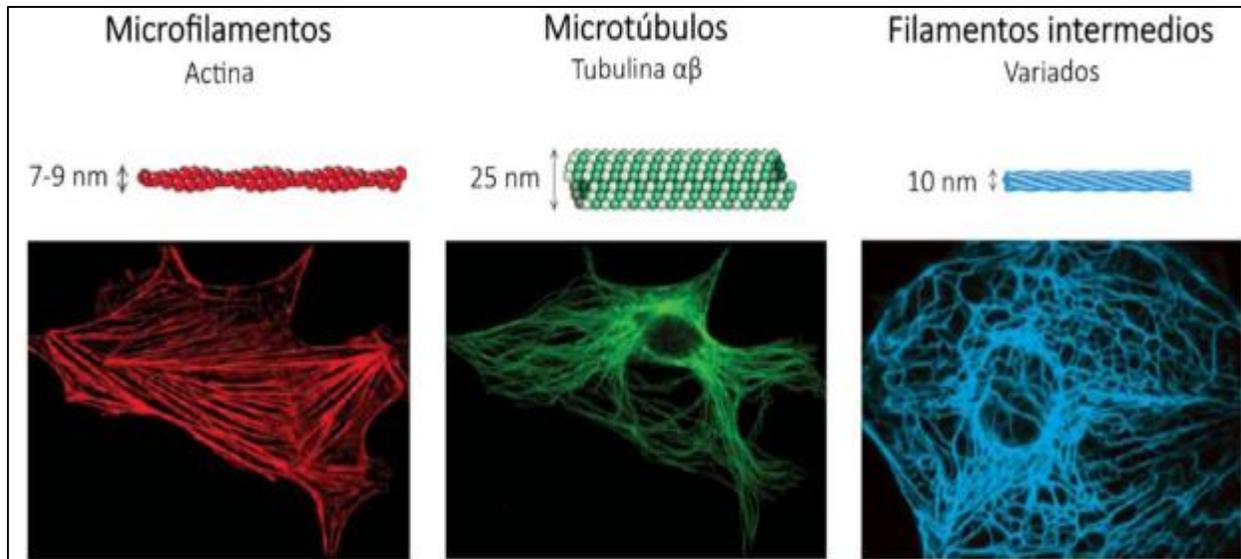


Figura 1.5 Estructura y longitud de los componentes presentes en el citoesqueleto de la célula.

1.4.3. *Filamentos intermedios*

Estos filamentos no se polimerizan como los microtúbulos y microfilamentos, sino que su principal función es resistir la tensión de la célula; es decir, provee de una función mecánica; tienen un diámetro aproximado de 10 nm, y sus proteínas varían según el tipo de célula en la que estén presentes. Se encuentran clasificados en cinco grupos, cada uno representado por su estructura; a los miembros del grupo I se les considera filamentos citoplasmáticos, los del grupo I y II contienen queratinas ácidas y básicas mezcladas y expresadas de acuerdo con el tipo celular en el que se encuentren; por otro lado, en el grupo III se encuentran los homopolímeros de vimentina, desmina, periferina o proteína ácida glial. La vimentina se encuentra principalmente en fibroblastos y células endoteliales; por otro lado, los filamentos del grupo IV se expresan principalmente en el sistema nervioso y, finalmente los filamentos del grupo V no están involucrados en los otros grupos mencionados anteriormente, y éstos están representados por la filensina y la faquinina [75]. Se organizan en paquetes, redes, o estructuras no filamentosas [78].

1.5. *Efecto de los MPs de PS sobre el citoesqueleto*

Los MPs de PS pueden resultar potencialmente peligrosos por su fácil transportación atmosférica [79]; incluso un estudio demostró que los materiales de laboratorio pueden ser fuente de MPs secundarios [9].

En investigaciones recientes se ha demostrado que los MPs de PS provocan múltiples respuestas y afectaciones a las funciones fisiológicas de los organismos. Choi D., *et al.* [80] demostraron que la toxicidad de los MPs de PS está influenciada por factores químicos como la liberación de colorantes o aditivos con los que son fabricados, o factores físicos como la forma y tamaño de los MPs, que podrían provocar daños en la membrana de las células favoreciendo la muerte de diversas líneas celulares, tales como células mononucleares de sangre periférica, células de cáncer gástrico KATO III, HeLa y fibroblastos dérmicos humanos.

Por su parte, Hesler M., *et al.* [20], estudiaron cualitativamente la respuesta intracelular de los MPs de PS en tejidos que funcionan como una barrera en el organismo, como lo son el tracto gastrointestinal, considerado como entrada potencial de los MPs al organismo; y la placenta, que protege al feto y regula el paso selectivo de diversas biomoléculas. Estos estudios, realizados en células intestinales y células de placenta humana que fueron expuestas a MPs de PS por 24 horas, demostraron que los MPs esféricos de PS con un diámetro de 0.5 μm pueden penetrar ambos tipos de células, disminuyendo la presencia de actina en las células expuestas a los MPs *versus* las no expuestas.

Stock V., *et al.* [21], evaluaron la adherencia o inserción de los MPs de PS en macrófagos usando MPs fluorescentes, para demostrar si las partículas se quedan en el exterior o en el interior de las células del epitelio intestinal. Estas investigaciones demostraron que el tamaño de los MPs de PS es un factor determinante para su ingreso y acumulación en el espacio intracelular, ya que los MPs de menor tamaño (1 y 4 μm) ingresaron con mayor facilidad a las células evaluadas en comparación con los MPs de mayor tamaño (10 μm). Los resultados demostraron que las partículas de 4 μm de diámetro son las que más ingresaron a las células, probablemente porque los macrófagos o células de epitelio intestinal, pueden absorber partículas de entre 0.5 y 10 μm por fagocitosis o por pinocitosis/micropinocitosis. Adicionalmente, a través del teñido de la actina presente en el citoesqueleto se pudo determinar si los MPs se encontraban dentro o encima de las células del tejido epitelial intestinal, lo que ratifica que la captación de MPs es dependiente del tamaño.

Con estas investigaciones previas se demostró que el ingreso y bioacumulación de los MPs de PS en el espacio intracelular, alteran la disposición espacial de los componentes del citoesqueleto, particularmente de actina; sin embargo, estos estudios habían mostrado una reorganización cualitativa. En este sentido, estudios realizados por Haddadi A., *et al.* [81], evaluaron la

bioacumulación de MPs de PS de 5 μm administradas vía oral en un modelo murino; los resultados mostraron la acumulación de MPs de PS en el duodeno y en diferentes partes del tejido ovárico, en los cuales, se detectó una baja en la expresión tanto del gen como de la proteína α -tubulina, demostrando que la bioacumulación de los MPs de PS induce la alteración de este componente del citoesqueleto, involucrado en procesos de división celular.

Por su parte, Wei Y., *et al.* [82], demostraron que la administración por sonda de MPs de PS de 4 μm y 10 μm , tiene efectos negativos en la barrera hematotesticular de ratas macho, ya que la ingestión de los MPs por 28 días consecutivos, promovió una disminución en la cantidad y calidad del esperma, así como de la capacidad de transporte iónico de la barrera hematotesticular. Por otro lado, respecto a los efectos sobre el citoesqueleto, este estudio demostró que la ingestión de MPs de PS promovió un aumento de una proteína relacionada con la actina (Arp2/3), la cual facilita la remodelación de la barrera hematotesticular y participa en la ramificación de la actina. En contraste con el aumento de Arp2/3, el sustrato 8 de la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico (Eps8) mostró una disminución, hecho que resultó en una desorganización de la actina, ya que este factor tiene un papel en la agrupación de la actina y hace que la barrera se oprima.

JUSTIFICACIÓN

Los MPs de PS son un contaminante emergente muy abundante en los ecosistemas, acuático, terrestre y aéreo. Sin embargo, a pesar de que existe evidencia de que los MPs pueden acceder a diversos tejidos provocando alteraciones en el metabolismo y la reproducción de los organismos, poco se sabe sobre los mecanismos celulares que se alteran para permitir que estas micropartículas lleguen a estos sitios y permanezcan prácticamente imperceptibles, debido a que no hay una sintomatología clara que indique su presencia, particularmente de los MPs aéreos los cuales tienen un diámetro de 1 a 10 μm . En este sentido, estudiar el efecto que tiene la presencia de los MPs de PS (1 μm) sobre el citoesqueleto de células pulmonares resulta interesante, sobre todo bajo la premisa de que el citoesqueleto es una estructura celular y dinámica, que promueve la mecanotransducción de señales del exterior hacia el interior de la célula, lo que le permite censar y mediar los cambios morfológicos a nivel celular. Por lo antes expuesto, este estudio contribuirá al entendimiento de la interacción de los MPs con células pulmonares.

HIPÓTESIS

Los MPs de PS serán capaces de promover cambios morfológicos en células alveolares, a través de la alteración de los componentes del citoesqueleto.

OBJETIVOS

Objetivo principal

- Evaluar el efecto de MPs de PS sobre el citoesqueleto de células alveolares humanas A549.

Objetivos específicos

- Determinar de las características topográficas/morfológicas de los MPs de PS mediante Microscopia de Fuerza Atómica (AFM) y Microscopia Confocal.
- Evaluar la afectación de los componentes del citoesqueleto de las células alveolares humanas A549 en presencia de los MPs de PS, mediante inmunocitoquímica.

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

2.1. Determinación de las características topográficas de los MPs de PS

Los MPs de PS se obtuvieron de Thermofisher F13081 (Bleiswijk, Países Bajos) y fueron FluoSpheres (microesferas de PS de 1 μm de diámetro que absorben y emiten en la región del amarillo-verde fluorescente). La elección de estos MPs fue con la finalidad de trabajar en el rango de los MPs atmosféricos que están en un intervalo de 1 a 10 μm [22].

Para determinar las características topográficas y morfológicas (morfo-topográficas) de los MPs se realizó AFM el cual se llevó a cabo en un microscopio de fuerza atómica de la marca Bruker modelo INNOVA SPM (Santa Bárbara, California USA) utilizando el modo Tapping. Las imágenes se obtuvieron en atmósfera de aire a 25 °C con una punta de silicón comercial en forma de cantiléver, con una frecuencia de resonancia de 320 KHz. La punta usada fue la TESP nanoprobe (Bruker Santa Bárbara, California USA), con una constante de resorte de 42 N/m y 2 nm de radio de la punta. La frecuencia de escaneo fue de 0.3 Hz.

Se preparó la muestra colocando una gota de 10 μL de una suspensión de MPs de PS sobre mica, misma que fue colocada en un disco de muestra de metal fijado al soporte con cinta aislante. El diámetro de los MPs se determinó en al menos 3 imágenes con las siguientes áreas de exploración: 5 μm x 5 μm , 10 μm x 10 μm y 20 μm x 20 μm .

Respecto al análisis por microscopía confocal, las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal FV-100, Olympus Corporation (Tokio, Japón). La muestra fue preparada colocando una gota de 10 μL de los MPs de PS en un portaobjetos, que posteriormente se cubrió y fijó con un cubreobjetos. La preparación se observó en el microscopio obteniendo la visualización de las micropartículas a longitudes de 495/505 nm, de absorción y emisión respectivamente, valores con los cuales se detectó la fluorescencia y forma esférica de los MPs. Este análisis permitió la determinación del diámetro y forma de los mismos y se calibró el equipo para su visualización en los siguientes experimentos.

2.2. Evaluación del efecto de los MPs de PS sobre los componentes del citoesqueleto

2.2.1. Cultivo de células alveolares humanas

El procedimiento del cultivo celular se llevó a cabo en función de literatura reportada [83] y de acuerdo a la ISO 10993-5 [84]. En este estudio se utilizó la línea celular humana A549 de cáncer

de pulmón humano, donada por la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); se cultivó en medio DMEM, Powdered Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose, con rojo de fenol, suplementado al 10% con Suero Fetal Bovino, Antibiótico/Antimicótico al 1%, e incubadas a 37 °C, con CO₂ al 5% en una incubadora celular (Binder CB 160 – UL, Tuttingen, Alemania).

Las células se cultivaron con el propósito de obtener la cantidad adecuada de células para los siguientes ensayos, en frascos de cultivo de 25 cm², estériles y con tapas que contienen un filtro de 0.22 µm. Se monitorearon los cultivos usando un microscopio invertido Labomed modelo iVu 5000 (Los Ángeles, California); cada tercer día los cultivos fueron retirados de la incubadora para realizarles cambios de medio. Esta monitorización se realizó para verificar el crecimiento de la población de las células, hasta tener una confluencia al 90%, y realizar los ensayos subsecuentes.

Al lograr la confluencia adecuada, se llevó a cabo el proceso de tripsinización para despegar las células que se encuentran adheridas a los frascos de cultivo y/o disgregar agrupaciones celulares, rompiendo las uniones que mantienen las células. Para la tripsinización se hicieron dos lavados con Buffer Fosfato Salino (PBS 1X) al frasco de cultivo, que después se desechó. Se agregó 1 mL de tripsina al 0.25% para luego colocarlo en la incubadora, durante aproximadamente 1 minuto a 37 °C, hasta verificar en el microscopio que las células pudieron desprenderse; finalizado este lapso, se retiró de incubación, se realizó una ligera agitación manual al frasco de cultivo y con una pipeta se succionó y expelió el medio para separar las células que permanecía adheridas, dando como resultado la suspensión celular. Dicha suspensión fue colocada en un tubo cónico de 15 mL, con 1 mL de medio DMEM, el cual se resuspendió una vez más, para finalmente centrifugar a 1200 rpm por 10 minutos, a 25 °C en una centrífuga refrigerada marca Centurion Scientific modelo K241 (Ciudad del Cabo, Sudáfrica) para obtener el botón celular.

El botón celular fue resuspendido en 2 mL de DMEM con SFB al 10%, con una micropipeta hasta dispersarlo para realizar una suspensión celular homogénea, para colocar 300 µL del botón resuspendido en cada pozo de las cámaras de cultivo; al llegar a confluencia del 90% se procedió a realizar el ensayo de inmunocitoquímica descrito a continuación.

2.2.2. Evaluación de los componentes del citoesqueleto de células alveolares humanas en presencia de los MPs de PS.

Este ensayo se llevó a cabo en función de la literatura reportada [20, 21, 72]. Las células se expandieron en cámaras de cultivo de 8 celdas como se muestra en la Figura 2.1, durante 24 horas; posteriormente, las células se expusieron a diferentes concentraciones de MPs: 10, 100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a 24, 48 y 72 horas en condiciones estándar de cultivo celular. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de las celdas y, se efectuaron tres lavados con PBS por 1 minuto a 25 °C. Posteriormente se adicionaron 300 μL de acetona y se incubó a 25 °C por 30 segundos para generar poros a la membrana de las células. Se realizaron 3 lavados con PBS, y se adicionó Paraformaldehído (PFA) al 4 % (v/v), diluido en agua destilada, por 8 minutos; se desechó el PFA y se hicieron 3 lavados posteriores con PBS.



Figura 2.1 Cámaras de cultivo de 8 celdas con células A549

Después, se agregó una solución de Tritón X-100 al 0.05% en PBS durante 8 minutos, para permeabilizar la membrana celular, y se realizaron dos lavados con PBS por 1 minuto. Seguidamente se agregó Albúmina de Suero Bovino (BSA) al 2% (w/v) diluido en PBS, para cubrir completamente la muestra y se incubó por 1 hora a 25 °C, para bloquear y evitar que algún componente celular pueda interferir con la unión del antígeno-anticuerpo.

La BSA se retiró, y se añadieron 20 μL del anticuerpo primario contra anexina (5va Sigma), vimentina (Sigma V6389), actina (C4 MAB1501 Sigma- Aldrich) y tubulina (KMX-1) a diluciones 1:100 μL durante toda la noche a 4 °C, cubriendo las cajas de cultivo con parafilm para evitar la

evaporación del anticuerpo primario. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con PBS a 4 °C, por 1 minuto.

Consecutivamente se agregaron 100 µL del anticuerpo secundario Anti-Ratón hecho en cabra acoplado a FITC (Zymax), en una dilución 1:100 µL en BSA, en cuarto oscuro y se incubó en éste durante 1 hora a 25 °C. El sobrenadante del anticuerpo secundario se descartó y se realizaron lavados con PBS por 1 minuto.

Pasada la hora, se añadieron 50 µL faloidina-rodamina en cuarto oscuro, para teñir el citoesqueleto de actina en las células, con una dilución 1:250 µL durante 1 hora.

Finalmente se realizaron lavados con PBS durante 1 minuto, luego se añadieron 100 µL diamidino-2-fenilindol (DAPI) en oscuridad, en dilución 1:10 µL durante 5 minutos; el sobrenadante de DAPI se retiró y se colocó un medio de montaje Dako Fluorescent, para observar en un microscopio confocal FV-100, Olympus Corporation (Tokio, Japón); los MPs fueron detectados a una longitud de onda de 495 nm, mientras que el anticuerpo acoplado a FITC fue detectado a una longitud de onda de 488 nm.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Características morfo-topográficas de los MPs de PS

Se realizó AFM y microscopía confocal para obtener imágenes morfo-topográficas de los MPs de PS. Las micrografías de AFM en la Figura 3.1 mostraron que los MPs de PS, presentan una morfología esférica, lisa y con un diámetro de 1 μm . Es importante mencionar que el diámetro observado en las imágenes AFM comprende a los MPs aéreos característicos, ya que según lo reportado [22], éstos se encuentran en un intervalo de tamaños que van de 1 a 10 μm .

Debe considerarse que los MPs desde que son liberados al medio ambiente sufren un constante cambio en su forma, estructura química y tamaño, pues se exponen a procesos de degradación, envejecimiento químico, y translocación [85]; lo anterior es debido a condiciones ambientales como exposición a rayos UV, viento, lluvia, etc. [86]. Debido a esto, los MPs en la naturaleza se encuentran en diferentes tamaños, colores y formas; por ejemplo, se han reportado gránulos, fragmentos de películas, fibras y espumas [87], cuya diversidad de características cambiantes favorece un ambiente en el que los microorganismos como las bacterias e invertebrados logran una interacción con estas partículas [88]; lo anterior genera no solo una transformación biológica, sino que genera cambios físicos en la topografía superficial, puesto que se han observado cambios en la rugosidad superficial de los MPs [89, 90]. Sin embargo, para este estudio se utilizaron MPs puros para facilitar el objetivo a estudiar, ya que presentan características que podremos controlar, como la concentración, la forma, la topografía. A pesar de lo anterior, debe considerarse que la química de superficie de éstos, es diferente a los MPs encontrados en el medio ambiente.

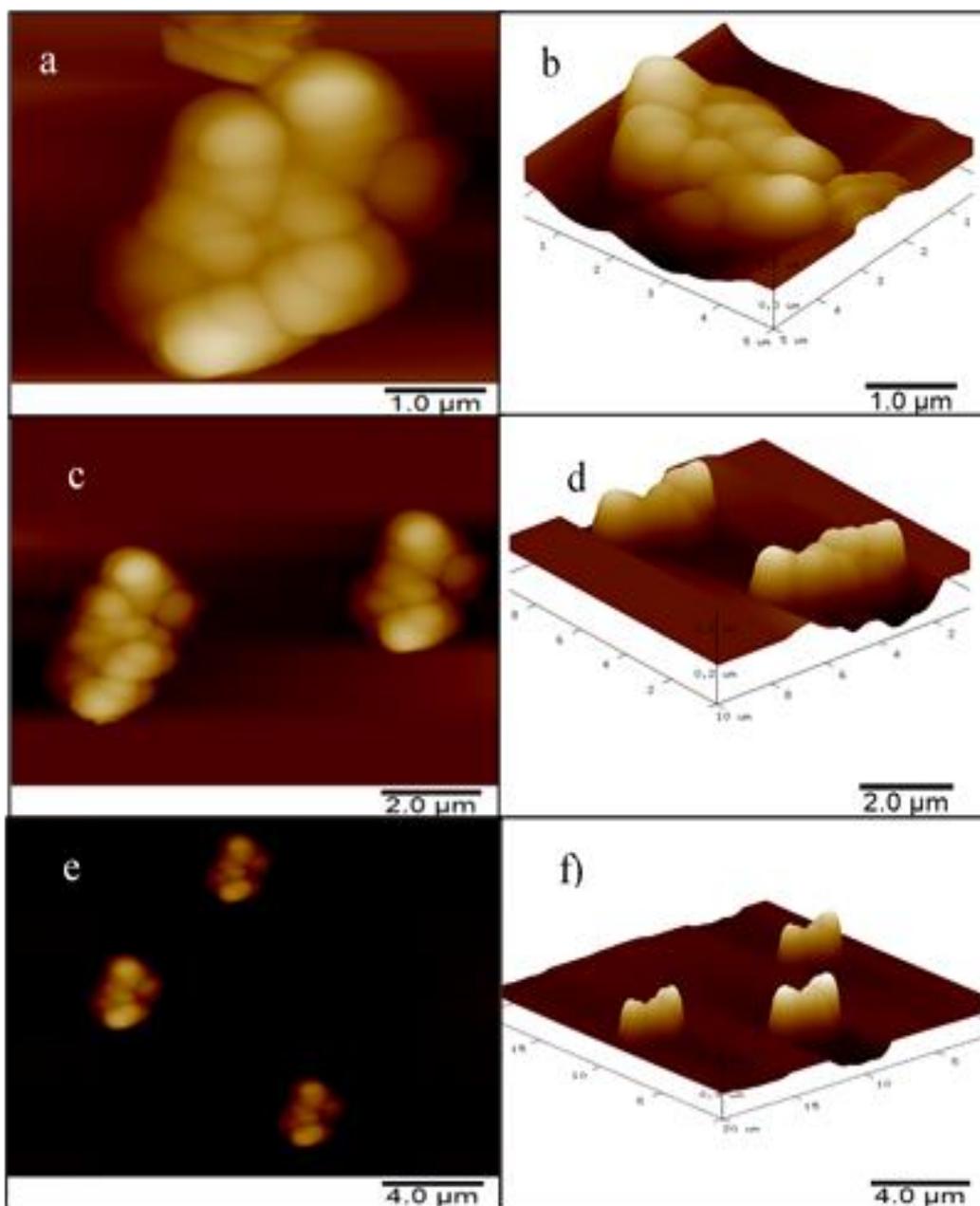


Figura 3.1 Imágenes AFM representativas de MPs de PS. a), c) y d) son imágenes en 2D, mientras que b), d) y f) son representaciones en 3D. Las imágenes se tomaron en tres áreas de exploración: $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$; $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ y $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$.

Del mismo modo, el análisis por microscopia confocal de los MPs de PS permitió observar la morfología esférica de los MPs y confirmar su diámetro de $1\ \mu\text{m}$ (ver Figura 3.2) así como la emisión de fluorescencia en el rango de los verdes, en una longitud de onda de $495/505\ \text{nm}$.

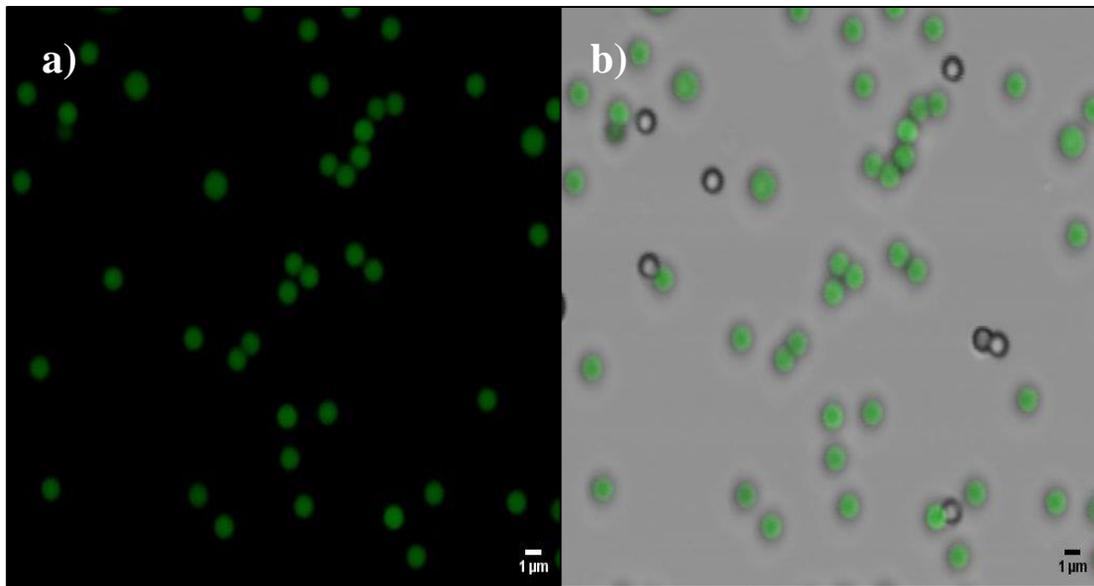


Figura 3.2 Microscopia confocal de los MPs de PS. Las imágenes corresponden a una excitación de 495 nm y una emisión de 505 nm. Ambos lados son la visualización de MPs, en a) se observa la fluorescencia de los MPs y en b) se corrobora en el campo claro la localización visual correcta de los MPs.

3.2. Efectos de los MPs de PS sobre los componentes del citoesqueleto de las células alveolares humanas.

La afectación de componentes del citoesqueleto como la actina, anexina, tubulina y vimentina se analizó mediante inmunocitoquímica de las células alveolares humanas A549 en contacto con los MPs a diferentes concentraciones (10, 100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y a diferentes tiempos de exposición (24, 48 y 72 horas).

Esta línea celular se ha usado para representar al epitelio pulmonar alveolar tipo II humano y ha sido utilizada para estudiar diversos procesos epidemiológicos, toxicológicos [91] y genotóxicos [92], incluso relacionados con la internalización de micropartículas [93]. Por otro lado, en cuestión del polímero elegido, se ha comprobado que el PS es uno de los polímeros que más contribuye a la contaminación atmosférica [94].

➤ Efecto de los MPs de PS sobre la actina

El citoesqueleto cumple una función importante y esencial al brindarle forma a la célula, así como la capacidad de sentir (mecanosensación) los estímulos externos y pasarlos (mecanotransducción) hacia el interior de la célula para generar una respuesta. En particular, se sabe que los filamentos de actina generan fibras de estrés que dotan a la célula de resistencia mecánica ante diferentes fuerzas de cizallamiento, por lo que participan en la formación y distribución de adherencias celulares, determina la movilidad y la morfología celular, y tienen un papel esencial en la mitosis celular, ya que promueven el anillo contráctil que dará origen a las dos células hijas [95]. En este sentido, se evaluó el efecto de la exposición de los MPs de PS sobre la disposición de la actina; los resultados a las 24 horas de exposición con MPs a la mínima concentración (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mostraron la acumulación de los MPs en la zona perinuclear de las mismas; los MPs no se muestran aglomerados y las células parecen conservar su forma. En cuanto a las fibras de actina, no se aprecia una alteración en su disposición o cantidad con la presencia de estas partículas; de igual manera se visualizan células en diferentes estadios de la división celular. Interesantemente se observan algunas células en telofase (última fase de la división celular), indicando de esta manera que la presencia de MPs parece no alterar el proceso mitótico.

Por otro lado, a una mayor concentración (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), las células parecen estar en contacto cercano con las células vecinas y las fibras de actina se visualizan compactas; los MPs presentan una ligera aglomeración.

Finalmente, a la máxima concentración (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se observó una acumulación mayor de los MPs en las células, aunque continua observándose la división celular, ya que a esta concentración de MPs también se apreciaron células en telofase. Las fibras de actina resultaron ligeramente estiradas en comparación con los resultados observados a menores concentraciones (10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y, comparado con el control, se pudo observar con más detalle la localización de los MPs a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pues las imágenes demostraron una aglomeración de los mismos; éstos se alojaron principalmente en la zona perinuclear de las células, aunque también se observaron MPs en los núcleos. No se observó una afectación en la población celular independientemente de la concentración de MPs. Los resultados observados durante 24 horas en las tres concentraciones se visualizan en la Figura 3.3.

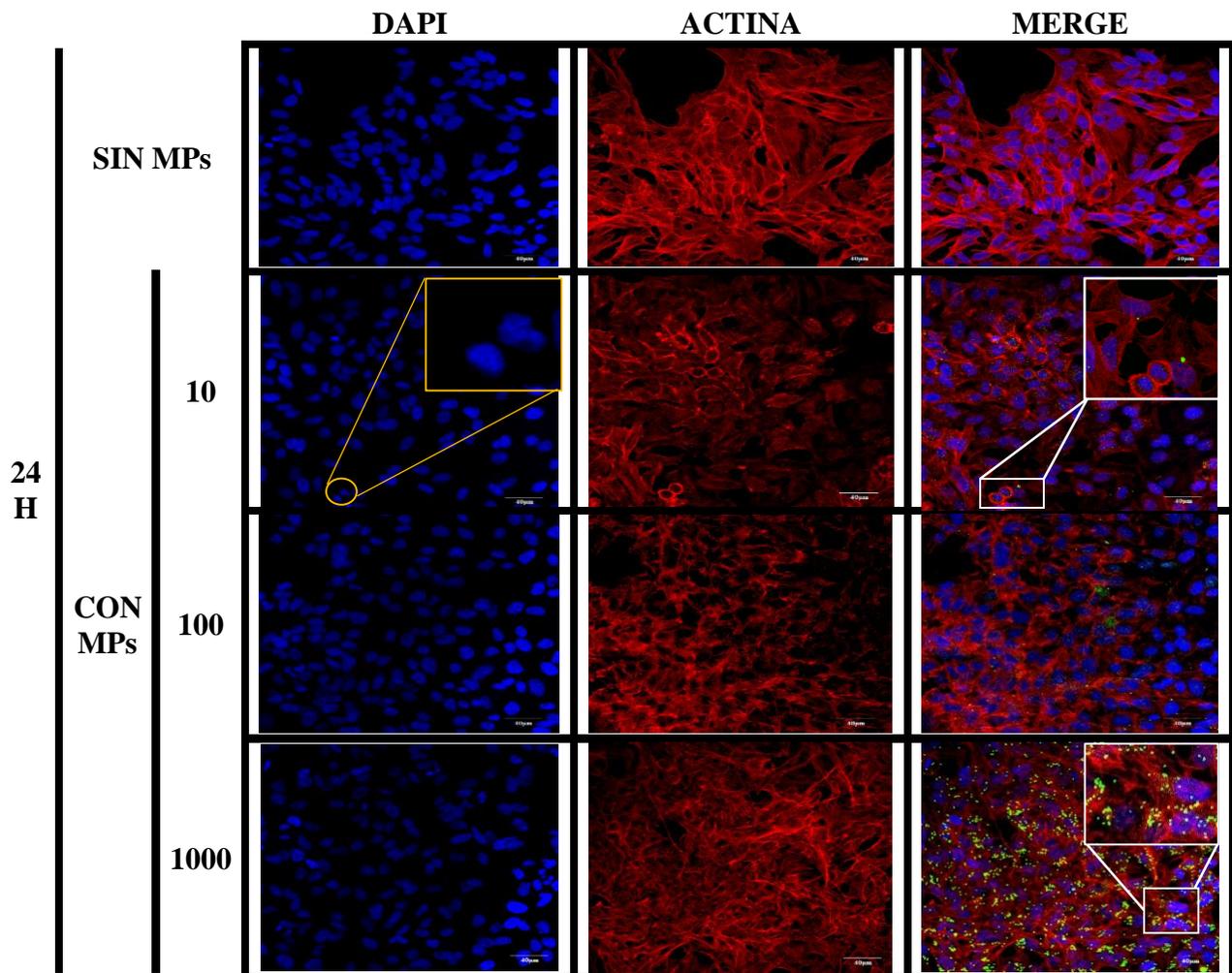


Figura 3.3 Efecto de los MPs de PS sobre la actina a 24 horas de exposición. Las micropartículas autofluorescentes en color verde que se visualizan en las imágenes representan los MPs de PS. Se utilizó una barra de escala de 40 μm .

Al incrementar el tiempo de exposición de los MPs de PS, a 48 horas (ver Figura 3.4), se observó que a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, las fibras de estrés de la actina parecen desordenadas y revueltas, por lo que las células se observan ligeramente estiradas; sin embargo, pese a esto, los núcleos se observan normales, destacando la presencia de células mitóticas y en telofase temprana y tardía; la población celular se mantiene a pesar del tiempo de exposición. Los MPs se concentran en zonas aleatorias del cultivo celular y se muestran escasos. A una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ de MPs de PS, las fibras de actina continúan desordenadas y es relevante que estas alteraciones no impiden el proceso mitótico, ya que la presencia de núcleos en proceso de división celular continúa.

Por último, en la concentración mayor de 1000 $\mu\text{g/mL}$, se observó una retracción de las proyecciones citoplasmáticas de las células, pues las fibras de actina se visualizan en forma de tubo; también se puede observar un estiramiento por parte de estas fibras y, por lo tanto, un cambio en la morfología de las células. En este caso se puede visualizar una disminución del número de células y la presencia de MPs alojados principalmente en la zona perinuclear.

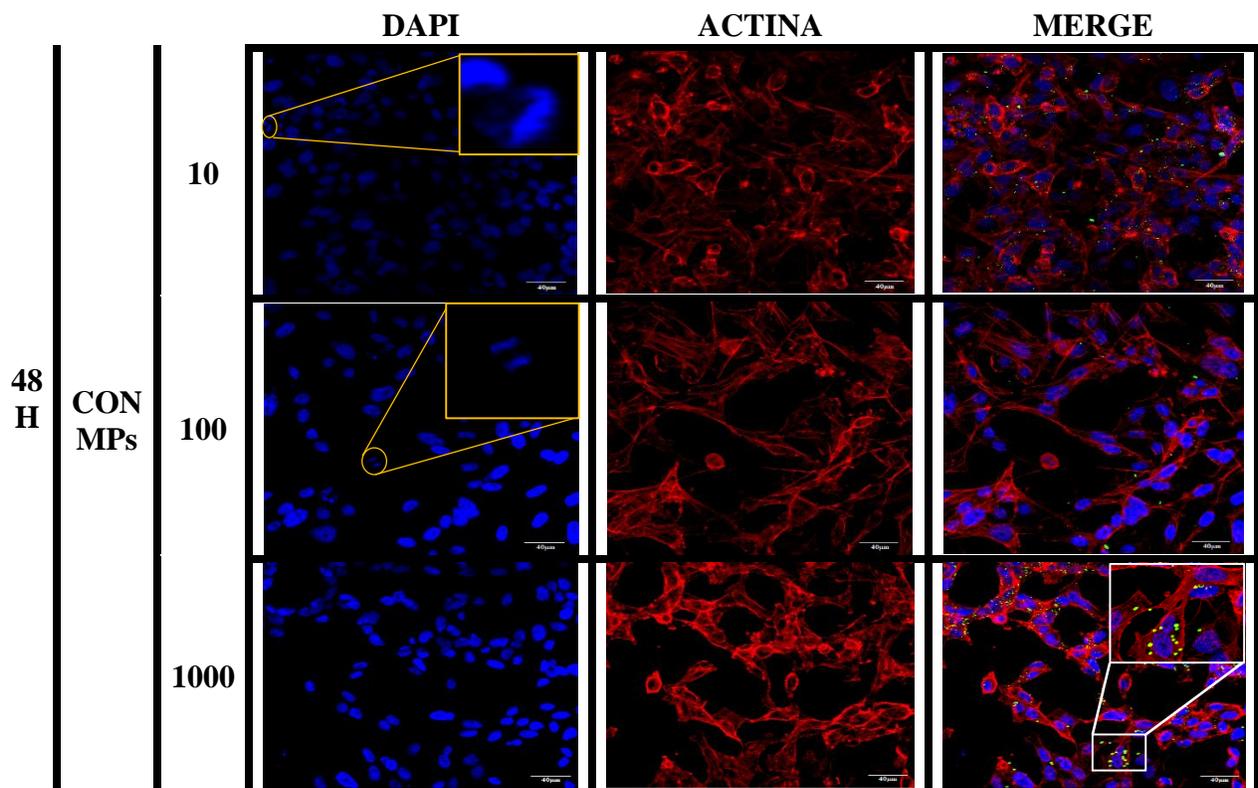


Figura 3.4 Efecto de los MPs de PS sobre la actina a 48 horas de exposición. Las micropartículas autofluorescentes en color verde que se visualizan en las imágenes representan los MPs de PS. Los círculos amarillos representan núcleos de células en división celular. Se utilizó una barra de escala de 40 μm .

Finalmente, los resultados observados durante 72 horas en las tres concentraciones se visualizan en la Figura 3.5. En este tiempo se pudo observar que la población celular (área de cultivo con células adheridas) disminuyó mientras aumentaba la concentración de MPs, tal y como se observó a las 24 y 48 horas de exposición. Del mismo modo, la división celular parece no afectarse con la presencia de estas micropartículas, las imágenes que se visualizan a la mínima concentración (10 $\mu\text{g/mL}$) muestran que las fibras de actina están desorganizadas. Los MPs se acumularon principalmente alrededor del núcleo; de igual manera se pudo observar que, en algunas células, los

MPs pudieron internalizarse en el núcleo, y también existió una acumulación de estas micropartículas; sin embargo, las células continúan su proceso de la división celular.

Por otro lado, en la concentración intermedia (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se observó una disminución en las células adheridas al pozo de cultivo; las fibras de actina parecen acortarse y disminuir sus proyecciones; de igual forma se observaron cúmulos de células. Así mismo, se logró ver que los MPs se concentran en zonas alrededor del núcleo celular; esto último se pudo observar también en la máxima concentración (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) al máximo tiempo evaluado (72 horas); las fibras de actina se mostraron acortadas, astilladas y desordenadas, la población celular disminuyó, y de igual manera las fibras de actina se visualizan más pequeñas. Del mismo modo se puede observar que las células expuestas a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PS-MPs, lograron una separación visible entre células vecinas, lo que podría explicar el acortamiento de sus proyecciones o el cambio en la forma de la actina. Los MPs se aglomeraron en la periferia de los núcleos; este resultado ha sido constante en los experimentos evaluados y discutidos hasta el momento.

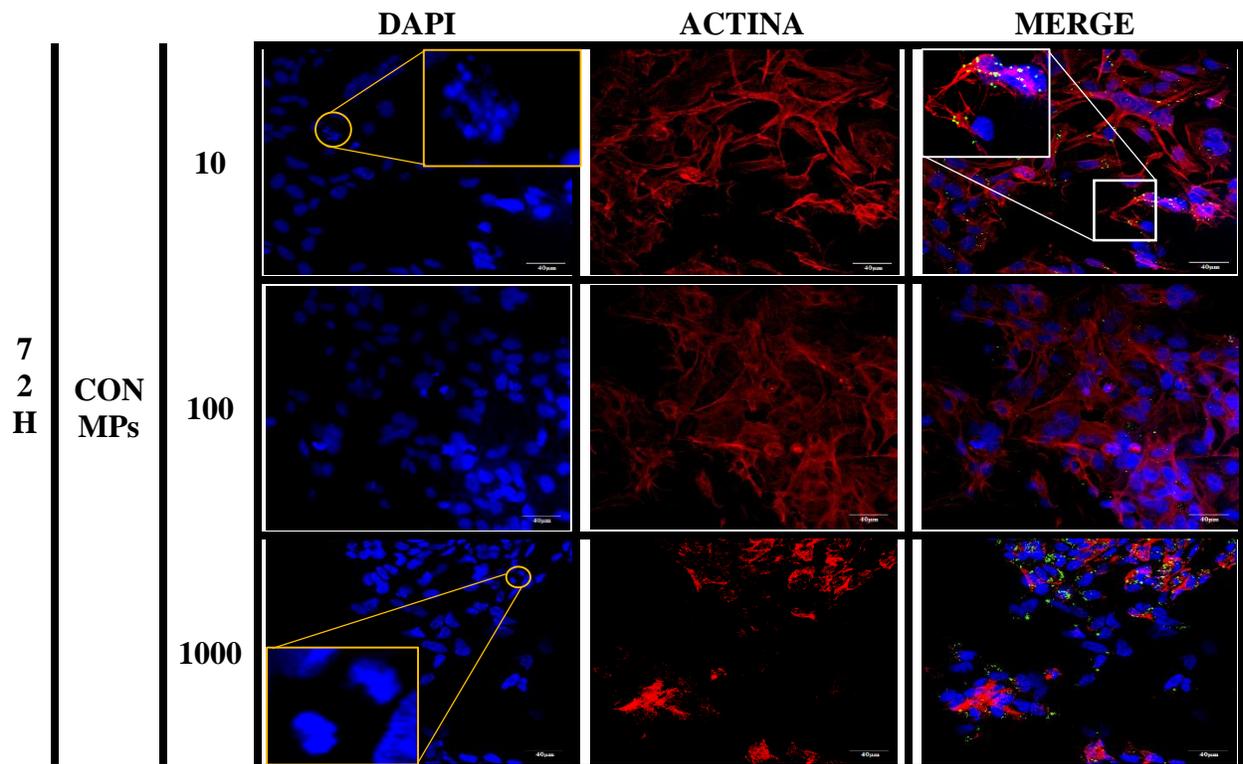


Figura 3.5 Efecto de los MPs de PS sobre la actina a 72 horas de exposición. Las micropartículas autofluorescentes en color verde que se visualizan en las imágenes representan los MPs de PS.

Los círculos amarillos señalan núcleos de células en división celular. Se utilizó una barra de escala de 40 μm .

➤ **Efecto de los MPs de PS sobre la anexina**

Otro componente del citoesqueleto evaluado ante la exposición de los MPs de PS fue la anexina, debido a que dicha proteína participa, junto con la actina, en la reorganización y la motilidad celular mediada por el citoesqueleto; además, cumple una función importante para el mantenimiento de la plasticidad en el citoesqueleto y es considerada como marcador de apoptosis [96, 97]. Este componente del citoesqueleto suele presentarse en la membrana celular plasmática [98] y en ensayos de fluorescencia la intensidad positiva es indicativo de muerte celular [99].

Las células expuestas por 24 horas y a la mínima concentración (10 $\mu\text{g/mL}$) se muestran extendidas, alargadas, adheridas y sin alguna afectación significativa; se visualizan núcleos en división celular, específicamente en telofase; los núcleos no presentan anomalías y, en cuanto a la anexina, se puede observar una marca positiva en escasas células, indicativo de ausencia de eventos apoptóticos; la morfología de las células se mantiene sin alteraciones.

En cuanto a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, las células parecen cambiar ligeramente su forma, mostrándose redondeadas, indicativo de pérdida de adhesión y en consecuencia de viabilidad; este tipo de células redondeadas dieron positivo para la marca de anexina, lo que sugiere procesos apoptóticos. Sin embargo, a esta concentración y tiempo de exposición, algunas células presentan núcleos activos (ovalados) y sin rastros de fragmentación nuclear, incluso se puede observar células en telofase tardía. Los MPs se encuentran principalmente en la membrana plasmática de la célula.

Finalmente, en la concentración máxima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ se observó la presencia de MPs en toda la célula, tanto en el citoplasma como en el núcleo; la mayor aglomeración se concentró alrededor del núcleo. Sin embargo, a pesar de tener una alta concentración y acumulación celular de los MPs, los núcleos no se ven afectados y la marca de anexina es escasa, la morfología de la célula se muestra más estriada. Los resultados antes mencionados con las tres concentraciones se ilustran en la Figura 3.6.

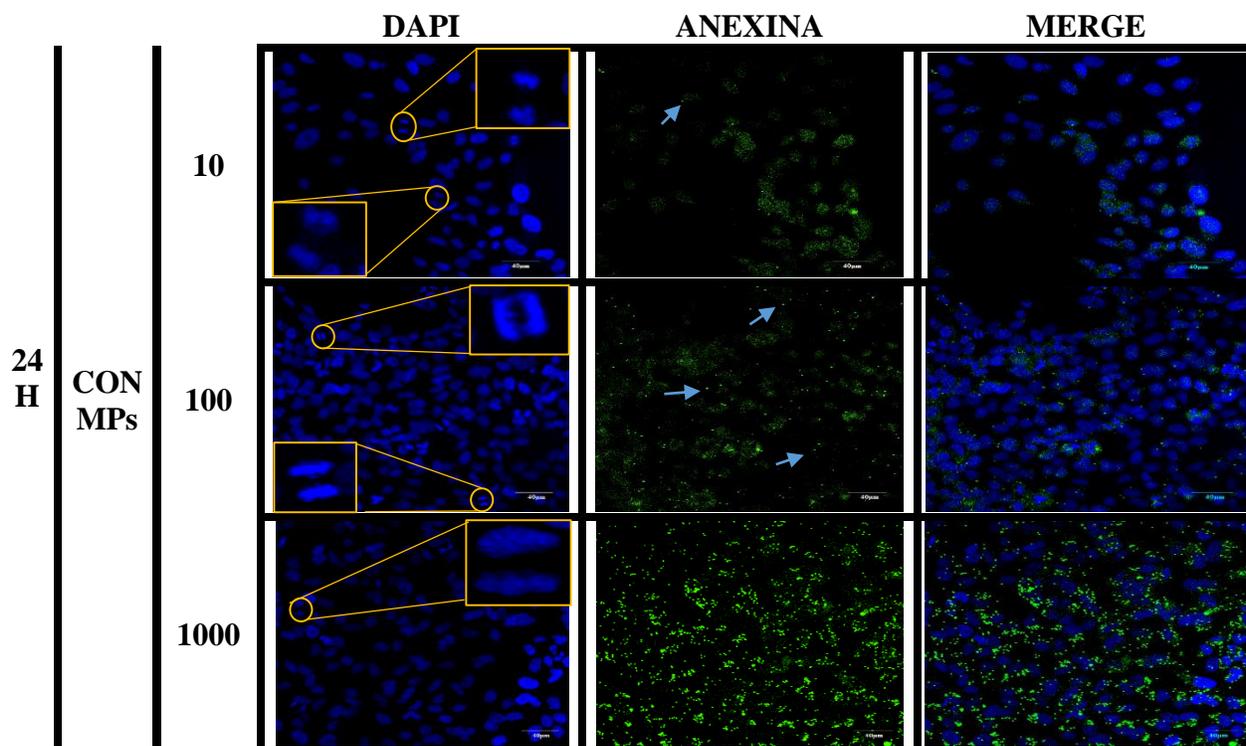


Figura 3.6 Efecto de los MPs de PS sobre la anexina a 24 horas de exposición. Las micropartículas autofluorescentes en color verde con mayor intensidad y morfología puntual (marcado con flechas azules) representan los MPs de PS. El punteado difuso corresponde a la presencia de anexina. Los círculos en amarillo representan los núcleos de células en división celular. Se utilizó una barra de escala de 40 μm .

A las 48 horas de exposición, con 10 $\mu\text{g/mL}$ de los MPs, los núcleos celulares conservan su morfología, y son escasas las células con morfología alterada (redondeada) que muestran positividad para la anexina. La morfología celular es la que presenta ligeros cambios al observar la forma más alargada con la internalización de los MPs.

En cuanto a las dos últimas concentraciones (100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$), los principales cambios observados fueron: en la concentración intermedia las células parecieran separadas, el contacto entre célula y célula disminuye, sin embargo hay células que, a pesar de la presencia de los MPs, se encuentran en división celular. Este hecho ocurre con más notoriedad en la máxima concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$, donde la localización recurrente de los MPs fue en la zona perinuclear. Los resultados antes mencionados con las tres concentraciones se ilustran en la Figura 3.7.

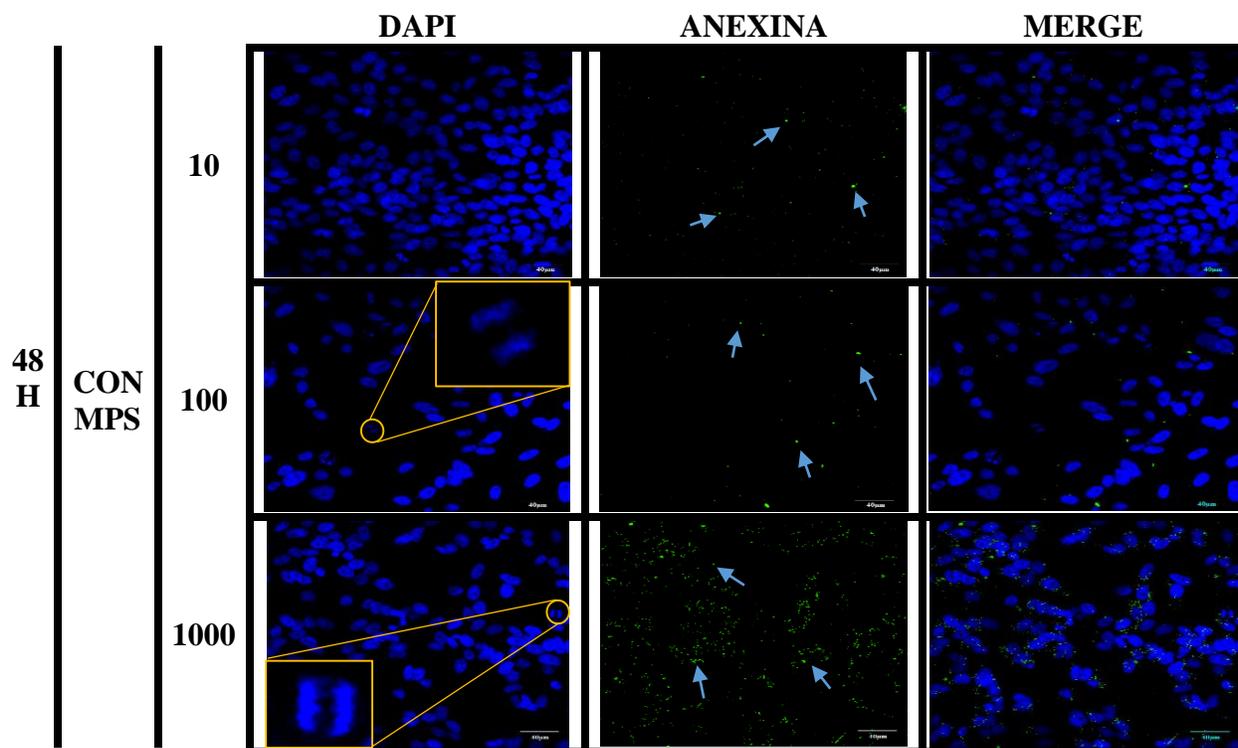


Figura 3.7 Efecto de los MPs de PS sobre la anexina a 48 horas de exposición. Las micropartículas autofluorescentes en color verde que se visualizan con mayor intensidad (marcado con flechas azules) en las imágenes representan los MPs de PS. El punteado difuso corresponde a la presencia de anexina. Los círculos en amarillo representan los núcleos de células en división celular. Se utilizó una barra de escala de 40 μm .

Al máximo tiempo evaluado (72 horas), y a la mínima concentración (10 $\mu\text{g/mL}$), se observó que algunas células presentan alteraciones, sin embargo, también hay evidencia de división celular. La marca de anexina parece ser mínima.

En la exposición a 100 $\mu\text{g/mL}$ se visualiza que la población celular disminuye y muestras una morfología compactada; los MPs se concentran alrededor de los núcleos y, en este caso, tal y como ocurre con el anterior, la marca de anexina es mínima.

Finalmente, los resultados de la máxima concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ a 72 horas, se visualizan con más notoriedad los cambios en los núcleos, en lo referente al tamaño y forma de las células. Además, se observa con mayor detalle los MPs internalizados en las células; se visualizan menos células con alteraciones en la morfología (redondeadas). Los resultados antes mencionados con las tres concentraciones, ver Figura 3.8.

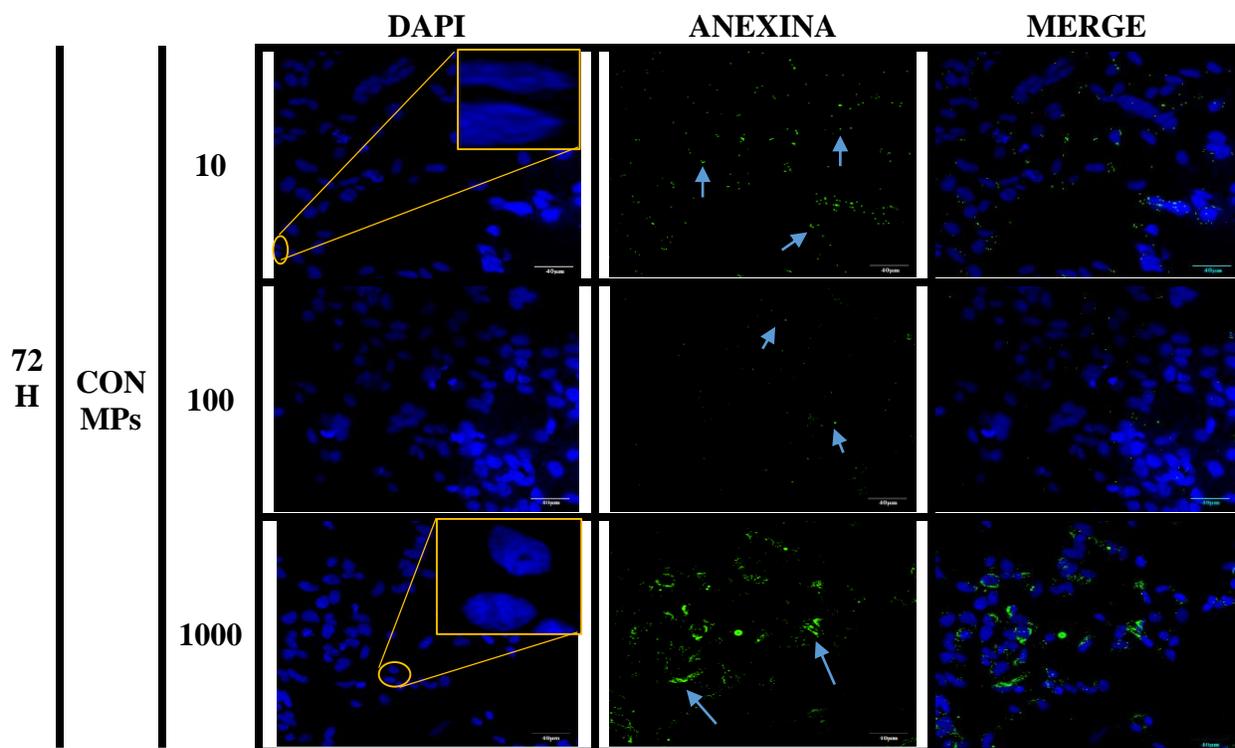


Figura 3.8 Efecto de los MPs de PS sobre la anexina a 72 horas de exposición. Las micropartículas autofluorescentes en color verde que se visualizan con mayor intensidad (marcado con flechas azules) en las imágenes representan los MPs de PS. El punteado difuso corresponde a la presencia de la anexina. Los círculos en amarillo representan los núcleos de células en división celular. Se utilizó una barra de escala de 40 μm .

➤ Efecto de los MPs de PS sobre la tubulina

Un tercer marcador para visualizar los cambios en el citoesqueleto es la tubulina; esta proteína se encuentra principalmente en los microtúbulos, por lo que participa en la regulación de la división celular, la mecanotransducción y la organización interna de la célula [100]. Esta proteína también es usada para evaluar la apoptosis en las células, pues los microtúbulos del citoesqueleto, al estar constituidos por heterodímeros de tubulina y al interferir con la dinámica sobre la polimerización y despolimerización de ésta, resulta en el bloqueo mitótico y apoptosis celular [101].

De igual manera se evaluaron condiciones de tiempo (24, 48, 72 horas) y concentraciones (10, 100, 1000 $\mu\text{g/mL}$). En el primer tiempo evaluado se observó que las células se encuentran estables y al parecer la exposición de MPs en periodos cortos, no causa daños importantes. Los MPs se

encontraron en el citoplasma celular y los núcleos se visualizaron sin daño aparente; además existe evidencia de células en procesos de división celular.

En la segunda concentración (100 $\mu\text{g/mL}$) se observa la interacción célula-célula y la tubulina colocaliza con las células que están en proceso de división celular, específicamente en telofase, hecho que se puede observar en algunos núcleos que se visualizan en la Figura 3.9. Lo cual significa que, la presencia de los MPs parece no afectar su proceso.

Finalmente, en la máxima concentración, se visualizan con más claridad a los MPs, los cuales lucen aglomerados en toda la célula, pero con mayor presencia en la periferia de los núcleos.

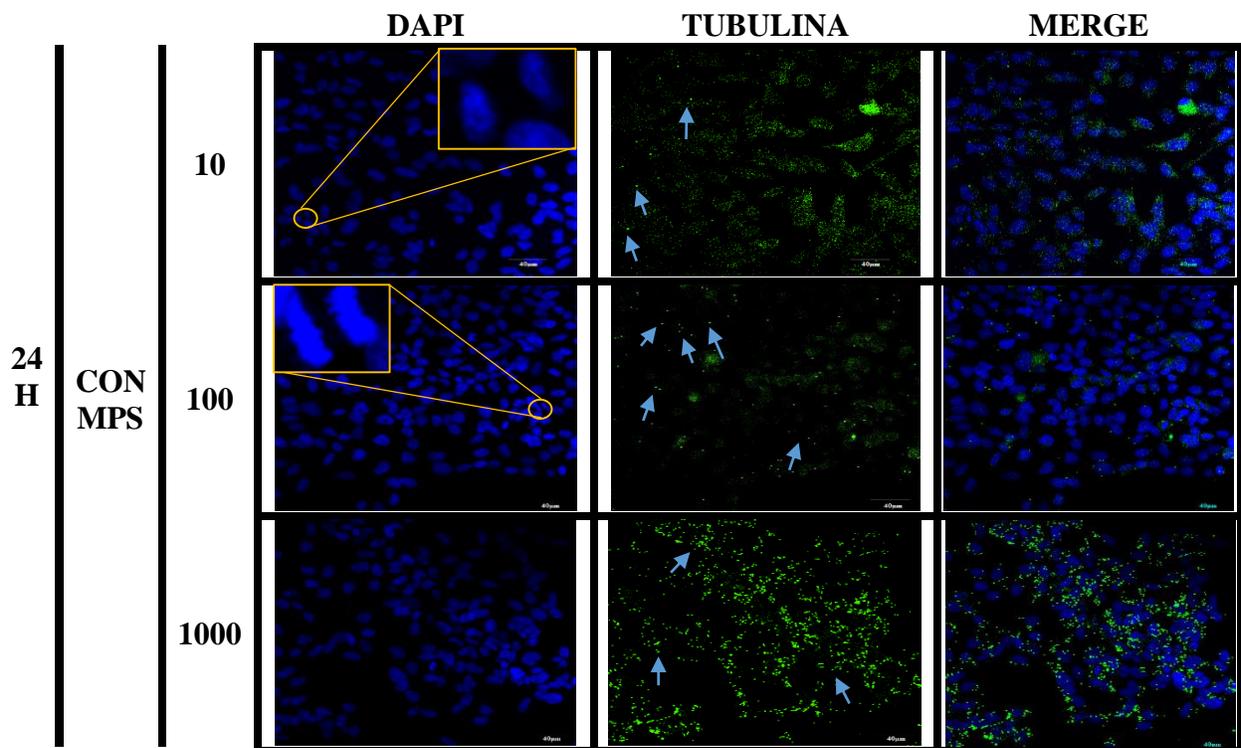


Figura 3.9 Efecto de los MPs de PS sobre la tubulina a 24 horas de exposición. Las micropartículas autofluorescentes en color verde que se visualizan con mayor intensidad (marcado con flechas azules) en las imágenes representan los MPs de PS. El punteado difuso corresponde a la presencia de la tubulina. Los círculos en amarillo representan los núcleos de células en división celular. Se utilizó una barra de escala de 40 μm .

En el segundo tiempo evaluado (48 horas), la tubulina mostró una distribución normal a todas las concentraciones de MPs analizadas, ya que la marca positiva para tubulina se localizó en las células con núcleos ovoides o binucleadas, indicativo de mitosis. También se aprecia una disminución en

el contacto célula-célula, pues se visualizaron espacios entre una y otra. Los MPs, se ubicaron de manera aleatoria en los cultivos celulares.

Finalmente, la diferencia más marcada se observó en la máxima concentración (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), en donde la marca positiva a tubulina colocalizó con células con morfología típica de procesos mitóticos, ya que exhiben núcleos ovoides y estirados. La población celular en general disminuyó proporcionalmente al incremento de la concentración de MPs, por lo que fue posible observar espacios intercelulares, indicativos de pérdida de contacto célula-célula. Sin embargo, se obtuvo evidencia de células en mitosis. La presencia y acumulación de MPs no se observa con claridad, ya que se localizan en la periferia de los núcleos, junto con la marca de la tubulina, y al estar en el mismo rango de verde, es difícil visualizar el tamaño de los MPs. Los resultados antes mencionados con las tres concentraciones, se ilustran en la Figura 3.10.

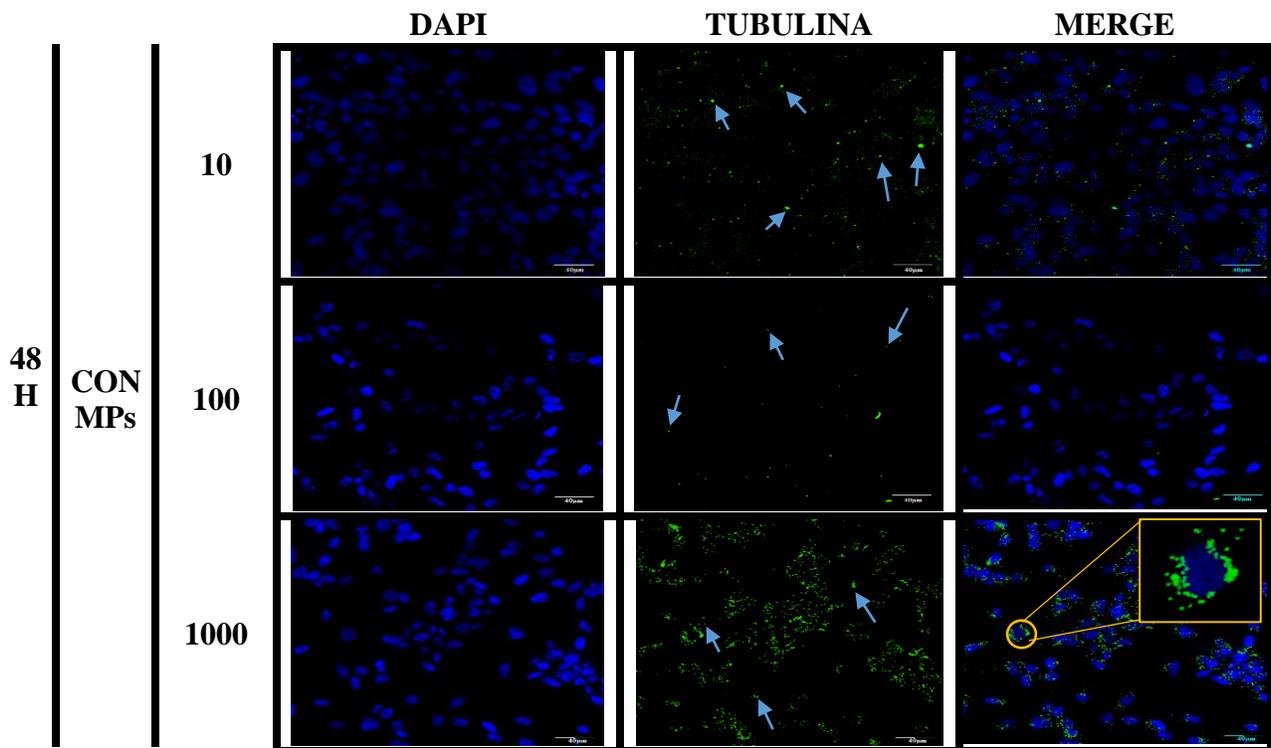


Figura 3.10 Efecto de los MPs de PS sobre la tubulina a 48 horas de exposición. Las micropartículas autofluorescentes en color verde que se visualizan con mayor intensidad (marcado con flechas azules) en las imágenes representan los MPs de PS. Los círculos en amarillo representan los núcleos de células en división celular. El punteado difuso corresponde a la presencia de la tubulina. Se utilizó una barra de escala de 40 μm .

A las 72 horas de exposición a los MPs de PS, se observó una disminución de la población celular (específicamente en la concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la aparición de amplios espacios entre las células conforme se incrementó la concentración de MPs; sin embargo, bajo las 3 concentraciones analizadas, se observaron células en mitosis. Los MPs se observaron alrededor del núcleo y existió aglomeración de éstos, específicamente a la concentración máxima. Los resultados antes mencionados con las tres concentraciones se ilustran en la Figura 3.11.

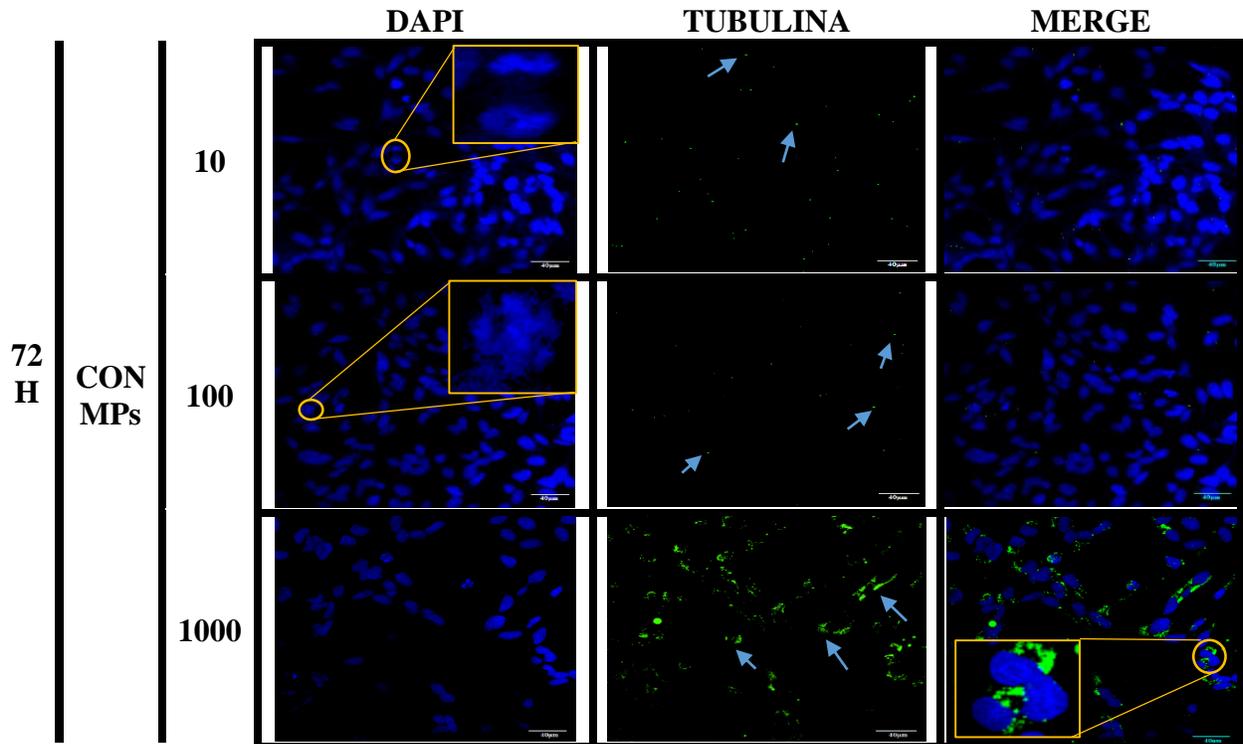


Figura 3.11 Efecto de los MPs de PS sobre la tubulina a 72 horas de exposición. Los MPs de PS que lucen en verde intenso y puntuales, con un tamaño de 1 μm de diámetro se indican con flechas azules. El punteado verde, que muestra fibras alrededor de los núcleos (azules) corresponde a la presencia de la tubulina. Los círculos en amarillo representan los núcleos de células en división celular. Se utilizó una barra de escala de 40 μm .

➤ Efecto de los MPs de PS sobre la vimentina

En cuanto a la vimentina se sabe que es una proteína que es capaz de soportar grandes tensiones sin romperse, por lo que se considera deformable [102]; se encuentra en varios tipos de tejido y también participa en el mantenimiento de la integridad celular y tisular; además es una de las

proteínas que se encuentran en los filamentos intermedios del citoesqueleto [103]. En este sentido, se decidió evaluar dicha proteína para observar los cambios ante la exposición de MPs.

La positividad a vimentina en las células alveolares disminuyó conforme se incrementó el tiempo de exposición y la concentración de los MPs. A 24 horas, la positividad hacia vimentina resultó menos evidente a 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3.12), mientras que a 48 horas (Figura 3.13), se observó que a 100 $\mu\text{g/mL}$ de MPs de PS, las células presentaron mayor marca positiva para vimentina.

A la máxima concentración (1000 $\mu\text{g/mL}$) y al máximo tiempo estudiado (72 horas), no se observó positividad para vimentina (Figura 3.14). A todas las concentraciones y tiempos analizados, las células se muestran activas, con núcleos ovalados y en diversas fases de la mitosis, pese a la acumulación de los MPs, los cuales continúan acentuándose en la periferia nuclear.

Adicionalmente, se observó una disminución de la población celular de manera directamente proporcional con el incremento del tiempo de exposición y la concentración de MPs de PS.

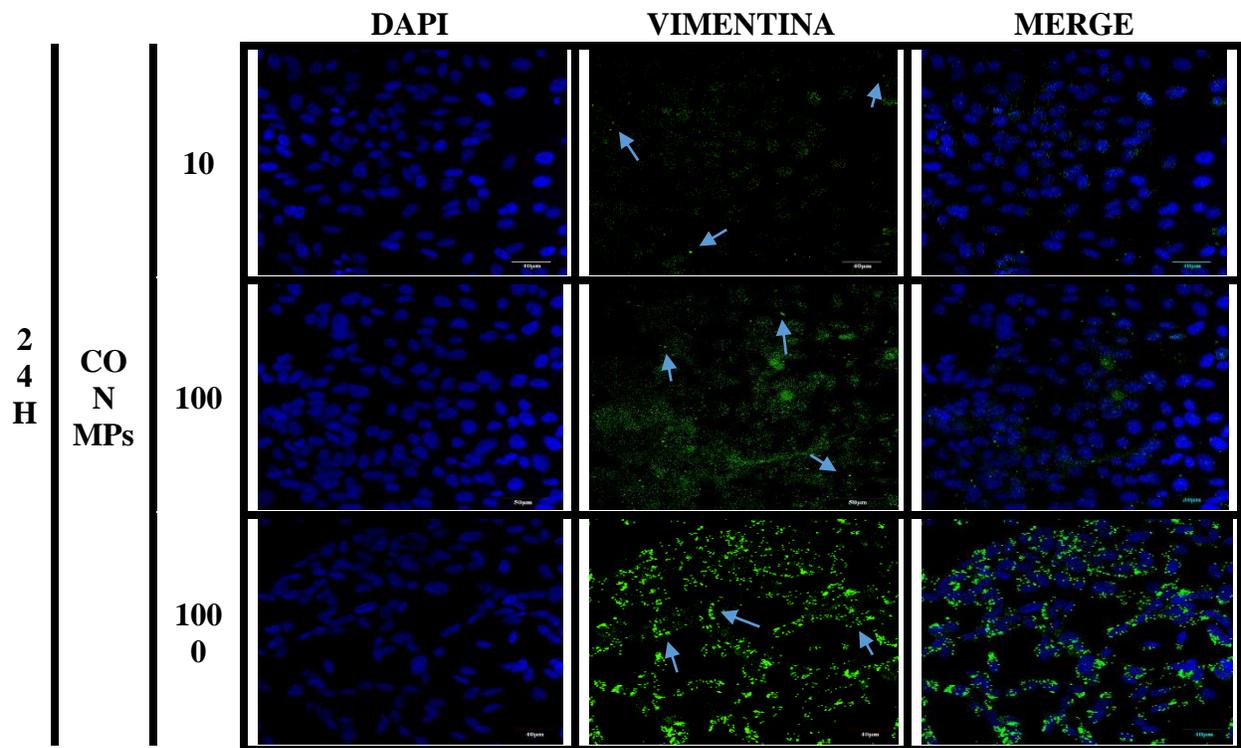


Figura 3.12 Efecto de los MPs de PS sobre la vimentina a 24 horas de exposición. Los MPs de PS que lucen en verde intenso y puntuales, con un tamaño de 1 μm de diámetro se indican con flechas azules. El punteado verde, que muestra fibras alrededor de los núcleos (azules) corresponde a la presencia de la vimentina. Se utilizó una barra de escala de 40 μm .

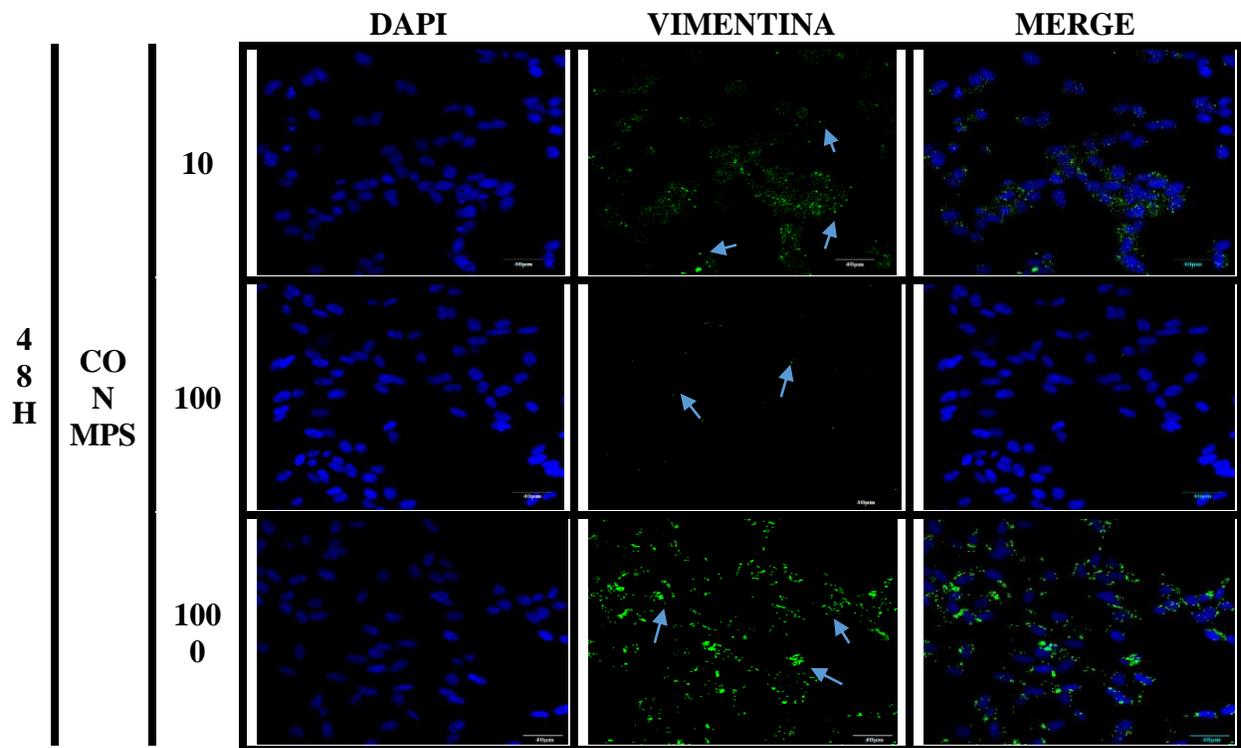


Figura 3.13 Efecto de los MPs de PS sobre la vimentina a 48 horas de exposición. Los MPs de PS que lucen en verde intenso y puntuales, con un tamaño de 1 μm de diámetro se indican con flechas azules. El punteado verde, que muestra fibras alrededor de los núcleos (azules) corresponde a la presencia de la vimentina. Se utilizó una barra de escala de 40 μm .

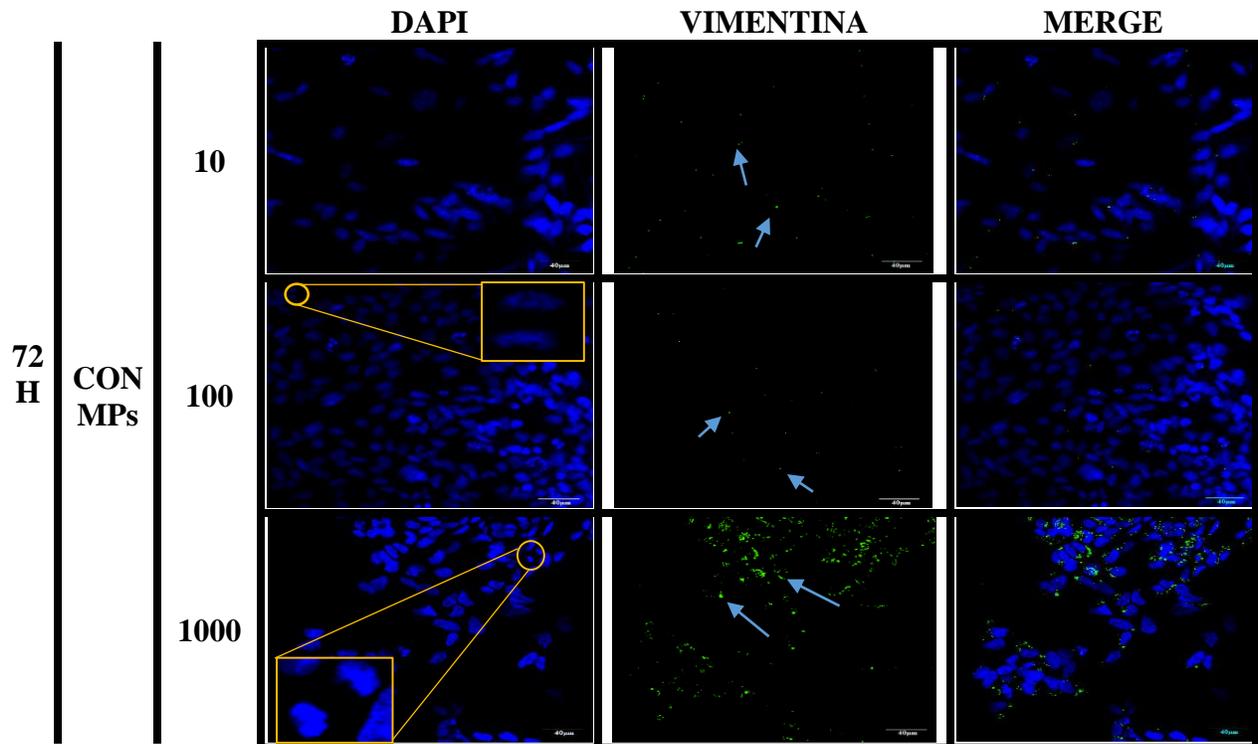


Figura 3.14 Efecto de los MPs de PS sobre la vimentina a 72 horas de exposición. Los MPs de PS que lucen en verde intenso y puntuales, con un tamaño de 1 μm de diámetro se indican con flechas azules. El punteado verde, que muestra fibras alrededor de los núcleos (azules) corresponde a la presencia de la vimentina. Se utilizó una barra de escala de 40 μm .

En general, la presencia de MPs de PS en células pulmonares humanas promovió alteraciones en la distribución y disposición espacial de los componentes del citoesqueleto como la actina, anexina, tubulina y vimentina; estas alteraciones incluyen: pérdida de contacto célula-célula, disminución de las proyecciones citoplasmáticas y adherencias focales, así como la presencia de células en apoptosis, lo cual es dependiente de la concentración de los MPs, así como del tiempo de exposición. De manera interesante, algunas células en contacto con los MPs mostraban núcleos mitóticos, por lo que fue posible detectar fases tempranas y tardías del proceso de división celular.

Respecto a la internalización de MPs de PS en células alveolares observada en este estudio, fue posible evidenciar que los MPs se aglomeraron generalmente en la zona perinuclear, la cual se acentúa con la concentración y el tiempo de exposición a los MPs. Probablemente dicha internalización este mediada por la actina, proteína principal del citoesqueleto que participa en la fagocitosis de micropartículas [104], por lo que probablemente este mecanismo esté activo y

favorezca la internalización de los MPs al interior de la célula, ya que la morfología de las células alveolares, se modificó proporcionalmente al tiempo de exposición y concentración de los MPs.

Recientemente (2022) se demostró la bioacumulación de MPs de PS alrededor de los núcleos de las células, hecho que no se había reportado con anterioridad; esta aglomeración en la zona perinuclear probablemente se deba a los poros presentes en el núcleo los cuales poseen un diámetro < 50 nm [105], por lo que los MPs de 1 µm de diámetro con forma esférica no pueden atravesar hacia el núcleo celular e interactuar con el nucleoesqueleto. Estos hallazgos son consistentes con trabajos previos de Jung B., *et al.* [106], quien demostró que NPs de PS de 100 nm de diámetro, a diferentes concentraciones (0, 100, o 200 mg/L), penetran en las células neuronales mixtas aisladas de la corteza embrionaria después de 24 horas de exposición; sin embargo, estas NPs se acumularon en zonas cercanas al núcleo, lo que provocó una disminución de la viabilidad y el aumento de la apoptosis de las células, aunque no atravesaron la membrana nuclear.

Es importante mencionar que el proceso de internalización de los MPs a las células no se ha esclarecido en su totalidad; sin embargo, hasta el momento se ha demostrado que hay factores que pueden influir en dicho proceso como el tipo de célula, el tamaño de partícula que ingresa, así como la morfología y composición química de la misma [16, 107, 108]. Dichos factores han sido considerados en diversos estudios; por ejemplo, uno de ellos realizado desde una aproximación proteómica, evaluó la internalización de MPs en macrófagos; células consideradas como limpiadoras de material particulado; este estudio demostró que los MPs de 10 µm de diámetro fueron los que promovieron una mayor alteración en la expresión de las proteínas analizadas, así como una mayor deformación celular, en comparación con MPs de menores tamaños (0.1, 1 µm) [109]. Dentro de las proteínas afectadas por la internalización de los MPs, se encontraron proteínas mitocondriales que participan en la organización de la estructura mitocondrial, proteínas lisosomales que modulan la capacidad fagocítica y/o del citoesqueleto, lo cual a su vez está relacionado con las alteraciones en la morfología celular, para finalmente permitir el paso de partículas.

De manera particular se observó en este trabajo, que la presencia de los MPs de PS indujo un alargamiento y adelgazamiento de los microfilamentos de la actina, proteína que le brinda la forma a las células. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por Wei Y., *et al.* [82], quienes reportaron que la administración oral de MPs de PS a ratones macho promueve una

desorganización de la actina en células de Sertoli de ratón, lo que conduce a una deformación celular de la barrera hematotesticular, así como la alteración de proteínas asociadas con la ramificación de la actina y, de apertura y cierre de la barrera hematotesticular. Estos hallazgos, probablemente se deban al impedimento estérico que representa la presencia de los MPs en el interior celular, ya que se ha demostrado que la actina es uno de los componentes del citoesqueleto con mayor actividad durante procesos como la fagocitosis, la endocitosis y la micropinocitosis [110-112]. Estos mecanismos de tráfico intracelular permiten la internalización de partículas a las células por medio de vesículas, vacuolas o exosomas, por lo que se produce el ingreso de partículas y líquidos extracelulares no específicos, hecho que ocasiona la reorganización de la misma [113, 114]; lo anterior podría explicar su reorganización en contacto con los MPs a las células, así como alteraciones en la morfología celular reportadas en el presente trabajo.

Por otro lado, en esta investigación, se observó que las células alveolares dieron positivo para anexina dependiendo de la concentración y tiempo de exposición a los MPs, y colocalizaron con células con morfología alterada, indicativo de apoptosis. Estos resultados concuerdan lo reportado previamente por Banerjee, *et al.* [115], quienes evaluaron la captación y/o toxicidad de MPs y NPs de PS en células gástricas humanas, variando dosis (0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tamaños de partículas (50, 100, 200, 500, 1000 o 5000 nm) y la funcionalización superficial (aminada, carboxilada). Esos estudios develaron que la marca positiva a anexina indicaba células en etapa tardía de la apoptosis o incluso necrosis, procesos que se acentuaban en presencia de MPs y NPs funcionalizados con (aminas y carboxilos) y de menor tamaño.

Por otro lado, la tubulina se visualizó en todas las concentraciones de MPs de PS analizadas, lo que indica que, pese a la presencia de los MPs, la actividad mitótica no se inhibe.

Finalmente, la evaluación de la vimentina que, junto con la actina proporcionan información sobre la morfología y filamentos intermedios de las células demostró que mientras el tiempo de exposición aumenta de 24 a 48 horas, la marca de vimentina incrementa de igual manera, sin embargo a 72 horas y a una concentración máxima de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ las células no presentaron marca positiva, lo que presenta similitud con la investigación de Lim B., *et al.* [116], quienes demostraron que la vimentina puede actuar como marcador para la fibrosis pulmonar al analizarse con éxito MPs de PS en tejidos pulmonares de ratas con exposición de partículas de 0.1 μm por 14 días de inhalación. Sin embargo, la marca de vimentina no presentó cambios significativos comparados

con las proteínas inflamatorias evaluadas (TGF- β y TNF- α), concluyendo que los cambios se observaron principalmente a nivel molecular, por lo que si la exposición continua podría causar daños a niveles mayores.

En cuanto a las concentraciones evaluadas para esta investigación (las cuales fueron de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$), debe mencionar que éstas contrastan con la cantidad reportada de MPs que ingerimos, debido que en la vida diaria estas partículas ingresan al organismo de manera constante y a través de diversas fuentes como alimentos, agua, aire, productos de uso diario, etc.

Los estudios reportan que la cantidad de ingesta de MPs en alimentos oscila en una cantidad de 11,000 partículas de plástico cada año por persona a través de alimentos, e incluso algunos reportes se ha sugerido que consumimos 237,250 partículas de plástico al año, solo al ingerir agua [9]. En contraste, se ha reportado que la cantidad de MPs que se ingieren a través del polvo de la calle se estima que es de $(1.4-6.8) \times 10^4$ MPs cada año por persona [35]. Las concentraciones utilizadas para esta investigación se encuentran por arriba de lo que se ha encontrado en humanos, sin embargo, para fines de este proyecto se observaron cambios y efectos a nivel celular, por lo que se puede inferir que, si la exposición y la concentración aumenta, estas partículas podrían acumularse y el daño pudiera alcanzar o traspasar sus efectos a diversos tejidos y ser causantes de daños o enfermedades afectando la salud humana.

Aunque se requiere de investigación adicional, el presente trabajo demuestra que el citoesqueleto y las proteínas que lo componen son importantes y esenciales para estudiar los cambios y efectos que experimentan las células alveolares humanas en presencia de los MPs de PS.

CONCLUSIONES

Se demostró que la presencia de los MPs promueve un cambio en la morfología y organización del citoesqueleto, hecho que sucedió principalmente en las fibras actina y filamentos de vimentina de las células pulmonares evaluadas.

La zona perinuclear de las células alveolares humanas fue el lugar donde mayor concentración y aglomeración de MPs de PS se observó; esta acumulación en la periferia del núcleo se acentuó conforme aumenta la concentración y el tiempo de exposición a los MPs. Del mismo modo, los cambios morfológicos en las células se hicieron notoriamente visibles y dramáticos con el paso del tiempo.

El modelo de células A549 en cultivo, expuestas a los MPs de PS, permitió establecer el estudio del mecanismo de ingreso y permanencia de los MPs y su efecto en la reorganización del citoesqueleto y sus implicaciones en la biología y funcionalidad de las células implicadas en la función respiratoria.

Los hallazgos reportados en este trabajo de tesis corroboran la hipótesis de trabajo y sugieren que el citoesqueleto es un factor importante para que la acumulación de los MPs tenga lugar, por lo que su estudio es vital para entender el mecanismo de ingreso y permanencia de los MPs a nivel celular.

PERSPECTIVAS

Con base a los resultados obtenidos, y para enriquecer este proyecto de tesis, sería interesante estudiar la viabilidad celular, así como realizar estudios sobre la medición del estrés oxidativo y citocinas, cuando las células estén expuestas a los MPs, esto con el fin de conocer más acerca de las posibles afecciones que ocasionan estas partículas a nivel celular y contribuir al entendimiento de los mecanismos de interacción e internalización que ocurren en las células. Además, en los ensayos de fluorescencia, usar un anticuerpo secundario con diferente longitud de onda que permita visualizar contrastes y cambios en las células con un mayor enfoque. Del mismo modo, el estudio del proceso de fagocitosis de los MPs, permitiría develar si este mecanismo de internalización de partículas está activo durante el tránsito de los MPs hacia el interior celular.

REFERENCIAS

1. Laskar, N. and U. Kumar, *Plastics and microplastics: A threat to environment*. Environmental Technology & Innovation, 2019. **14**(100352): p. 1-17.
2. Prata, J.C., et al., *Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects*. Science of The Total Environment, 2020. **702**(134455): p. 1-31.
3. Millican, J.M. and S. Agarwal, *Plastic Pollution: A Material Problem?* Macromolecules, 2021. **54**(10): p. 4455-4469.
4. Delgado Fimia, O., *Implicaciones de la exposición a microplásticos en salud humana*. Revisión bibliográfica, 2019.
5. Levermore, J.M., et al., *Detection of Microplastics in Ambient Particulate Matter Using Raman Spectral Imaging and Chemometric Analysis*. Analytical Chemistry, 2020. **92**(13): p. 8732-8740.
6. Biale, G., et al., *A Systematic Study on the Degradation Products Generated from Artificially Aged Microplastics*. Polymers, 2021. **13**(12): p. 1-23.
7. Cao, R., et al., *Opposite impact of DOM on ROS generation and photoaging of aromatic and aliphatic nano- and micro-plastic particles*. Environmental Pollution, 2022. **315**(1): p. 120304-120304.
8. Efimova, I., et al., *Secondary Microplastics Generation in the Sea Swash Zone With Coarse Bottom Sediments: Laboratory Experiments*. Frontiers in Marine Science, 2018. **5**(313): p. 1-15.
9. Hwang, J., et al., *Potential toxicity of polystyrene microplastic particles*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 7391-7391.
10. Prata, J.C., et al., *Solutions and Integrated Strategies for the Control and Mitigation of Plastic and Microplastic Pollution*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2019. **16**(13): p. 1-19.
11. Karmakar, G.P., *Regeneration and Recovery of Plastics*, in *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. 2020, Elsevier. p. 634-651.
12. Andrady, A.L., *The plastic in microplastics: A review*. Marine Pollution Bulletin, 2017. **119**(1): p. 12-22.

13. Mazhandu, Z.S., et al., *Integrated and Consolidated Review of Plastic Waste Management and Bio-Based Biodegradable Plastics: Challenges and Opportunities*. Sustainability, 2020. **12**(20): p. 8360-8360.
14. Sharma, S., et al., *Microplastics in the environment: Occurrence, perils, and eradication*. Chemical Engineering Journal, 2021. **408**(127317): p. 1-78.
15. Wright, S.L., et al., *Development of screening criteria for microplastic particles in air and atmospheric deposition: critical review and applicability towards assessing human exposure*. Microplastics and Nanoplastics, 2021. **1**(1): p. 1-18.
16. Lin, P., et al., *Nanoplastics aggravate the toxicity of arsenic to AGS cells by disrupting ABC transporter and cytoskeleton*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021. **227**(1): p. 112885-112885.
17. Sridharan, S., et al., *Microplastics as an emerging source of particulate air pollution: A critical review*. Journal of Hazardous Materials, 2021. **418**(126245): p. 1-15.
18. Ng-Blichfeldt, J.-P., et al., *TGF- β activation impairs fibroblast ability to support adult lung epithelial progenitor cell organoid formation*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2019. **317**(1): p. L14-L28.
19. Ambriz, X., P. de Lanerolle, and J.R. Ambrosio, *The Mechanobiology of the Actin Cytoskeleton in Stem Cells during Differentiation and Interaction with Biomaterials*. Stem Cells International, 2018. **2018**(2891957): p. 1-11.
20. Hesler, M., et al., *Multi-endpoint toxicological assessment of polystyrene nano- and microparticles in different biological models in vitro*. Toxicology in Vitro, 2019. **61**(104610): p. 1-53.
21. Stock, V., et al., *Uptake and effects of orally ingested polystyrene microplastic particles in vitro and in vivo*. Archives of Toxicology, 2019. **93**(7): p. 1817-1833.
22. Wright, S.L. and F.J. Kelly, *Plastic and Human Health: A Micro Issue?* Environmental Science & Technology, 2017. **51**(12): p. 6634-6647.
23. Beltran, M. and A. Marcilla, *Tecnología de polímeros. Procesado y propiedades*. 2012: Alicante, España. p. 17-20.
24. Shrivastava, A., *1 - Introduction to Plastics Engineering*, in *Introduction to Plastics Engineering*, A. Shrivastava, Editor. 2018, William Andrew Publishing. p. 1-16.

25. Geyer, R., *Production, use, and fate of synthetic polymers*, in *Plastic Waste and Recycling*. 2020, Elsevier. p. 13-32.
26. Geyer, R., *Chapter 2 - Production, use, and fate of synthetic polymers*, in *Plastic Waste and Recycling*, T.M. Letcher, Editor. 2020, Academic Press. p. 13-32.
27. Chamas, A., et al., *Degradation Rates of Plastics in the Environment*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2020. **8**(9): p. 3494-3511.
28. Alves, T.F.R., et al., *Applications of Natural, Semi-Synthetic, and Synthetic Polymers in Cosmetic Formulations*. Cosmetics, 2020. **7**(4): p. 1-16.
29. López, F., *Fundamentos de polímeros*. 2005. p. 1-63.
30. Deng, Z., et al., *Sequence-Defined Synthetic Polymers for New-Generation Functional Biomaterials*. ACS Materials Letters, 2021. **3**(9): p. 1339-1356.
31. Sastri, V.R., *Chapter 6 - Commodity Thermoplastics: Polyvinyl Chloride, Polyolefins, and Polystyrene*, in *Plastics in Medical Devices*, V.R. Sastri, Editor. 2010, William Andrew Publishing: Boston. p. 73-119.
32. Smith, W. and J. Hashemi, *Fundamentos de la ciencia e ingeniería de materiales*. 2004: México. p. 11-45.
33. Kumar, V., et al., *Polymers*, in *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. 2016, Elsevier.
34. Merrington, A., *Recycling of Plastics*, in *Applied Plastics Engineering Handbook*. 2011, Elsevier. p. 177-192.
35. Gaston, E., et al., *Microplastics Differ Between Indoor and Outdoor Air Masses: Insights from Multiple Microscopy Methodologies*. Applied Spectroscopy, 2020. **74**(9): p. 1079-1098.
36. Bilurbina, L. and F. Liesa, *Materiales no metálicos resistentes a la corrosión*. 1990: Barcelona, España. p. 33-35.
37. Ho, B.T., T.K. Roberts, and S. Lucas, *An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach*. Critical Reviews in Biotechnology, 2018. **38**(2): p. 308-320.
38. Taghavi, N., et al., *Challenges in biodegradation of non-degradable thermoplastic waste: From environmental impact to operational readiness*. Biotechnology Advances, 2021. **49**(107731): p. 1-19.

39. Kotova, I.B., et al., *Microbial Degradation of Plastics and Approaches to Make it More Efficient*. Microbiology, 2021. **90**(6): p. 671-701.
40. Fakhri, L.A., et al., *Photo-catalytic and biotic degradation of polystyrene packaging film: Effect of zinc oxide photocatalyst nanoparticles and nanoclay*. Chemosphere, 2021. **283**(130972): p. 1-37.
41. Maity, S., et al., *Functional interplay between plastic polymers and microbes: a comprehensive review*. Biodegradation, 2021. **32**(5): p. 487-510.
42. Hou, L. and E.L.W. Majumder, *Potential for and Distribution of Enzymatic Biodegradation of Polystyrene by Environmental Microorganisms*. Materials, 2021. **14**(3): p. 503-503.
43. Hale, R.C., et al., *A Global Perspective on Microplastics*. Journal of Geophysical Research: Oceans, 2020. **125**(1): p. 1-40.
44. Klingelhöfer, D., et al., *Research landscape of a global environmental challenge: Microplastics*. Water Research, 2020. **170**(115358): p. 1-27.
45. Lambert, S. and M. Wagner, *Microplastics Are Contaminants of Emerging Concern in Freshwater Environments: An Overview*. 2018. p. 1-23.
46. Enyoh, C.E., et al., *Microplastics Exposure Routes and Toxicity Studies to Ecosystems: An Overview*. Environmental Analysis Health and Toxicology, 2020. **35**(1): p. 1-10.
47. Onyena, A.P., et al., *Governance Strategies for Mitigating Microplastic Pollution in the Marine Environment: A Review*. Microplastics, 2021. **1**(1): p. 15-46.
48. Calero, M., et al., *Green strategies for microplastics reduction*. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, 2021. **28**(100442): p. 1-6.
49. Yu, J., et al., *Microplastics in soil ecosystem – A review of sources, fate, and ecological impact*. Plant, Soil and Environment, 2022. **68**(1): p. 1-17.
50. Jin, Y., et al., *Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish*. Environmental Pollution, 2018. **235**(2018): p. 322-329.
51. Oliviero, M., et al., *Leachates of micronized plastic toys provoke embryotoxic effects upon sea urchin *Paracentrotus lividus**. Environmental Pollution, 2019. **247**(2019): p. 706-715.
52. Wan, Z., et al., *Effects of polystyrene microplastics on the composition of the microbiome and metabolism in larval zebrafish*. Chemosphere, 2019. **217**(1): p. 646-658.

53. Ju, H., D. Zhu, and M. Qiao, *Effects of polyethylene microplastics on the gut microbial community, reproduction and avoidance behaviors of the soil springtail, Folsomia candida*. *Environmental Pollution*, 2019. **247**(1): p. 890-897.
54. Pannetier, P., et al., *Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental sample microplastics collected on beaches: Part I-adverse effects on fish cell line*. *Environmental Pollution*, 2019. **248**(1): p. 1088-1097.
55. Schymanski, D., et al., *Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: Release of plastic particles from different packaging into mineral water*. *Water Research*, 2018. **129**(1): p. 154-162.
56. Zhou, X., et al., *Polystyrene microplastic particles: In vivo and in vitro ocular surface toxicity assessment*. *Environmental Pollution*, 2022. **303**(119126): p. 154-162.
57. Wang, Y., et al., *Effects of ingested polystyrene microplastics on brine shrimp, Artemia parthenogenetica*. *Environmental Pollution*, 2019. **244**(1): p. 715-722.
58. Ragusa, A., et al., *Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta*. *Environment International*, 2021. **146**(106274): p. 1-8.
59. Schirinzi, G.F., et al., *Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells*. *Environmental Research*, 2017. **159**(1): p. 579-587.
60. Zhang, Q., et al., *Microplastic Fallout in Different Indoor Environments*. *Environmental Science & Technology*, 2020. **54**(11): p. 6530-6539.
61. Brachner, A., et al., *Assessment of Human Health Risks Posed by Nano-and Microplastics Is Currently Not Feasible*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020. **17**(23): p. 8832-8832.
62. Moujaber, O. and U. Stochaj, *The Cytoskeleton as Regulator of Cell Signaling Pathways*. *Trends in Biochemical Sciences*, 2020. **45**(2): p. 96-107.
63. Pironti, C., et al., *Microplastics in the Environment: Intake through the Food Web, Human Exposure and Toxicological Effects*. *Toxics*, 2021. **9**(224): p. 1-29.
64. Van Cauwenberghe, L. and C.R. Janssen, *Microplastics in bivalves cultured for human consumption*. *Environmental Pollution*, 2014. **193**(1): p. 65-70.
65. Liebezeit, G. and E. Liebezeit, *Non-pollen particulates in honey and sugar*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2013. **30**(12): p. 2136-2140.

66. Yang, D., et al., *Microplastic Pollution in Table Salts from China*. Environmental Science & Technology, 2015. **49**(22): p. 13622-13627.
67. Liebezeit, G. and E. Liebezeit, *Synthetic particles as contaminants in German beers*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2014. **31**(9): p. 1574-1578.
68. Amato-Lourenço, L.F., et al., *An emerging class of air pollutants: Potential effects of microplastics to respiratory human health?* Science of The Total Environment, 2020. **749**(141676): p. 1-25.
69. Wu, W.M., J. Yang, and C.S. Criddle, *Microplastics pollution and reduction strategies*. Frontiers of Environmental Science and Engineering, 2017. **11**(1): p. 1-4.
70. Choudhury, A., et al., *Microplastic pollution: An emerging environmental issue*. Journal of Entomology and Zoology Studies, 2018. **6**(6): p. 340-344.
71. Lee, H.-S., et al., *Adverse effect of polystyrene microplastics (PS-MPs) on tube formation and viability of human umbilical vein endothelial cells*. Food and Chemical Toxicology, 2021. **154**(112356): p. 1-9.
72. Wang, Q., et al., *Effects of bisphenol A and nanoscale and microscale polystyrene plastic exposure on particle uptake and toxicity in human Caco-2 cells*. Chemosphere, 2020. **254**(126788): p. 1-9.
73. Hohmann, T. and F. Dehghani, *The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork*. Cells, 2019. **8**(4): p. 1-58.
74. Bershadsky, A.D. and J.M. Vasiliev, *Cytoskeleton*. 1988, Springer US: Boston, MA. p. 1-10.
75. Duan, L., H. Chen, and J. Gao, *The Cytoskeleton of the System*, in *Laboratory Cell Biological Technic* 2018. p. 17-22.
76. Fletcher, D.A. and R.D. Mullins, *Cell mechanics and the cytoskeleton*. Nature, 2010. **463**(7280): p. 485-492.
77. Campbell, N. and J. Reece, *Biología*. 2005, Panamericana. p. 112-120.
78. Rojo, D., et al., *Proteínas asociadas a los componentes del citoesqueleto*. Revista CENIC, 2004. **35**(2): p. 89-95.
79. Enyoh, C.E., et al., *Airborne microplastics: a review study on method for analysis, occurrence, movement and risks*. Environmental Monitoring and Assessment, 2019. **191**(11): p. 668-668.

80. Choi, D., et al., *In vitro chemical and physical toxicities of polystyrene microfragments in human-derived cells*. Journal of Hazardous Materials, 2020. **400**(123308): p. 1-34.
81. Haddadi, A., et al., *Exposure to microplastics leads to a defective ovarian function and change in cytoskeleton protein expression in rat*. Environmental Science and Pollution Research, 2022. **29**(23): p. 34594-34606.
82. Wei, Y., et al., *Polystyrene microplastics disrupt the blood-testis barrier integrity through ROS-Mediated imbalance of mTORC1 and mTORC2*. Environmental Pollution, 2021. **289**(117904): p. 1-13.
83. Cao, H., et al., *Stability of quercetin in DMEM and cell culture with A549 cells*. eFood, 2022. **3**(3): p. 1-15.
84. *ISO 10993-5 (2009): Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.*: International Organization for Standardization, 10993-5:2009.
85. Yang, H., et al., *Characteristics, Toxic Effects, and Analytical Methods of Microplastics in the Atmosphere*. Nanomaterials, 2021. **11**(10): p. 1-20.
86. Andradý, A.L., et al., *Oxidation and fragmentation of plastics in a changing environment; from UV-radiation to biological degradation*. Science of The Total Environment, 2022. **851**(2): p. 158022-158022.
87. Kaur, P., K. Singh, and B. Singh, *Microplastics in soil: Impacts and microbial diversity and degradation*. Pedosphere, 2022. **32**(1): p. 49-60.
88. Fu, W., et al., *Separation, characterization and identification of microplastics and nanoplastics in the environment*. Science of The Total Environment, 2020. **721**(137561): p. 1-74.
89. McGivney, E., et al., *Rapid Physicochemical Changes in Microplastic Induced by Biofilm Formation*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020. **8**(205): p. 1-14.
90. Yuan, J., et al., *Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics*. Science of The Total Environment, 2020. **715**(136968): p. 1-9.
91. Wang, G., et al., *Ambient fine particulate matter induce toxicity in lung epithelial-endothelial co-culture models*. Toxicology Letters, 2019. **301**(1): p. 133-145.
92. Brandão, F., et al., *Genotoxicity of TiO₂ Nanoparticles in Four Different Human Cell Lines (A549, HEPG2, A172 and SH-SY5Y)*. Nanomaterials, 2020. **10**(3): p. 412-412.

93. Xu, M., et al., *Internalization and toxicity: A preliminary study of effects of nanoplastic particles on human lung epithelial cell*. *Science of The Total Environment*, 2019. **694**(133794): p. 1-10.
94. Allen, S., et al., *Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment*. *Nature Geoscience*, 2019. **12**(5): p. 339-344.
95. Hayes, M.J., et al., *Annexin-Actin Interactions*. *Traffic*, 2004. **5**(8): p. 571-576.
96. Ying, Y.-T., et al., *Annexin A2-Mediated Internalization of Staphylococcus aureus into Bovine Mammary Epithelial Cells Requires Its Interaction with Clumping Factor B*. *Microorganisms*, 2021. **9**(10): p. 2090-2090.
97. He, H., et al., *Annexin A2 Enhances the Progression of Colorectal Cancer and Hepatocarcinoma via Cytoskeleton Structural Rearrangements*. *Microscopy and Microanalysis*, 2019. **25**(4): p. 950-960.
98. Ashraf, S., J. Cheng, and X. Zhao, *Clumping factor A of Staphylococcus aureus interacts with AnnexinA2 on mammary epithelial cells*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 1-9.
99. Demchenko, A.P., *Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis*. *Cytotechnology*, 2013. **65**(2): p. 157-172.
100. Moujabber, O., et al., *Cellular senescence is associated with reorganization of the microtubule cytoskeleton*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019. **76**(6): p. 1169-1183.
101. Díaz, J.M., et al., *The Vacuolating Autotransporter Toxin (Vat) of Escherichia coli Causes Cell Cytoskeleton Changes and Produces Non-lysosomal Vacuole Formation in Bladder Epithelial Cells*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020. **10**(299): p. 1-12.
102. Dai, J. and Y. Yao, *Adaptive ordering and filament polymerization of cell cytoskeleton by tunable nanoarrays*. *Nano Research*, 2021. **14**(3): p. 620-627.
103. Liu, C.-Y., et al., *Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation*. *Oncotarget*, 2015. **6**(18): p. 15966-15983.
104. Barger, S.R., N.C. Gauthier, and M. Krendel, *Squeezing in a Meal: Myosin Functions in Phagocytosis*. *Trends in Cell Biology*, 2020. **30**(2): p. 157-167.
105. Han, S.-W. and K.-Y. Ryu, *Increased clearance of non-biodegradable polystyrene nanoplastics by exocytosis through inhibition of retrograde intracellular transport*. *Journal of Hazardous Materials*, 2022. **439**(1): p. 129576-129576.

106. Jung, B.-K., et al., *Neurotoxic potential of polystyrene nanoplastics in primary cells originating from mouse brain*. *NeuroToxicology*, 2020. **81**(1): p. 189-196.
107. Augustine, R., et al., *Cellular uptake and retention of nanoparticles: Insights on particle properties and interaction with cellular components*. *Materials Today Communications*, 2020. **25**(101692): p. 1-19.
108. Ramsperger, A.F.R.M., et al., *Environmental exposure enhances the internalization of microplastic particles into cells*. *Science Advances*, 2020. **6**(50): p. 1-10.
109. Collin-Faure, V., et al., *Does size matter? A proteomics-informed comparison of the effects of polystyrene beads of different sizes on macrophages*. *Environmental Science: Nano*, 2022. **9**(8): p. 2827-2840.
110. Su, R., et al., *The mechanisms of PM2.5 and its main components penetrate into HUVEC cells and effects on cell organelles*. *Chemosphere*, 2020. **241**(125127): p. 1-11.
111. Wang, W., et al., *The impact of nanoparticle shape on cellular internalisation and transport: what do the different analysis methods tell us?* *Materials Horizons*, 2019. **6**(8): p. 1538-1547.
112. Liu, L., et al., *Cellular internalization and release of polystyrene microplastics and nanoplastics*. *Science of The Total Environment*, 2021. **779**(146523): p. 1-12.
113. Kanno, S., et al., *Scavenger receptor MARCO contributes to cellular internalization of exosomes by dynamin-dependent endocytosis and macropinocytosis*. *Scientific Reports*, 2020. **10**(1): p. 21795-21795.
114. Chang, W.-H., R.A. Cerione, and M.A. Antonyak, *Extracellular Vesicles and Their Roles in Cancer Progression*. 2021. p. 143-170.
115. Banerjee, A., L.O. Billey, and W.L. Shelver, *Uptake and toxicity of polystyrene micro/nanoplastics in gastric cells: Effects of particle size and surface functionalization*. *PLOS ONE*, 2021. **16**(12): p. e0260803-e0260803.
116. Lim, D., et al., *Inhalation toxicity of polystyrene micro(nano)plastics using modified OECD TG 412*. *Chemosphere*, 2021. **262**(128330): p. 1-9.