

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala



UBIMED

“Efecto de la exposición a nanopartículas de dióxido de titanio en la función mitocondrial de pulmón”

Asesora: Dra. Yolanda Irasema Chirino López.

Alumno: Ismael Manuel Urrutia Ortega.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Efecto de la exposición a nanopartículas de dióxido de titanio en la función mitocondrial de pulmón”

Resumen

Introducción: Las nanopartículas de dióxido de titanio (NPs-TiO₂) son parte de los nanomateriales empleados en las últimas dos décadas en una gran cantidad de productos para consumo humano. Específicamente, las NPs-TiO₂ son utilizadas en diferentes industrias incluyendo la cosmética y la alimentaria, sin embargo, han sido clasificadas recientemente por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) en el grupo 2B de “posibles carcinógenos para humanos”. Entre los efectos descritos debidos a la exposición a NPs-TiO₂, se encuentran la capacidad de generar tumores en el tracto digestivo e inflamación pulmonar en ratas, inducción de daño a cromosomas y deformación de la estructura del DNA. Entre las alteraciones inducidas a la mitocondria se encuentra el aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la disminución en el consumo de oxígeno. Las alteraciones en la función mitocondrial inducidas por la exposición a NPs-TiO₂ son especialmente importantes, ya que este organelo regula la proliferación, la diferenciación y la programación de la muerte celular. Por otro lado, la exposición subtóxica a NPs-TiO₂ ha sido menos estudiada, pero es posible que las alteraciones inducidas por la exposición a este nanomaterial en bajas concentraciones, predisponga no sólo a alteraciones mayores cuando las mitocondrias son expuestas a un segundo reto oxidante, sino también podría causar alteraciones a nivel celular.

Objetivo: Determinar el efecto subtóxico de NPs-TiO₂ frente a un reto oxidante con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) sobre la función de mitocondrias aisladas de pulmón de rata y sobre la remodelación de citoesqueleto de células epiteliales de pulmón.

Metodología. Se determinó el efecto subtóxico de las NPs-TiO₂ aunado a un reto oxidante de H₂O₂. Se utilizaron los siguientes tratamientos: a) control b) NPs-TiO₂ c) H₂O₂ y d) NPs-TiO₂+H₂O₂. El efecto de las NPs-TiO₂ en la función de mitocondrias pulmonares de rata se midió mediante oximetrías y su potencial de membrana con rodamina 123. El efecto sobre las células epiteliales de pulmón se determinó con curvas de viabilidad utilizando la prueba del colorante metil tiazol tetrazolio (MTT). Con ayuda de la faloidina rodaminada se determinó el daño que provoca la concentración subtóxica de las NPs-TiO₂ sobre el citoesqueleto de actina de células epiteliales de pulmón.

Resultados: La función mitocondrial se vio modificada, el tratamiento NPs-TiO₂ + H₂O₂ disminuyó 50% el control respiratorio (CRI), la cantidad de nmol de oxígeno

consumidas por nmol de ADP fosforilado (P/O) disminuyó 66%, la fase lag y el potencial de membrana disminuyeron 50%. Las pruebas realizadas en células epiteliales muestran que los tratamientos de NPs-TiO₂, H₂O₂ NPs-TiO₂+ H₂O₂ no afectan la viabilidad celular. El tratamiento de NPs-TiO₂ + H₂O₂ indujo cambios conformacionales en el citoesqueleto de las células epiteliales.

Conclusión: La exposición a una concentración subtóxica de NPs-TiO₂ indujo predisposición a daño en la función de mitocondrias de pulmón de rata y cambios conformacionales en el citoesqueleto de células epiteliales de pulmón cuando se les aplicó un reto oxidante de H₂O₂.

Resumen.....	2
1. Introducción.....	6
1.1 Nanopartículas (NPs).....	6
1.1.2 NPs como contaminantes potenciales del ambiente.....	7
1.1.3 NPs de dióxido de titanio (NPs-TiO ₂).....	8
1.1.4 Principales vías de exposición a las NPs-TiO ₂	10
1.1.5 Efectos de las NPs-TiO ₂ en sistemas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	11
1.1.6 Modelos <i>in vivo</i>	11
1.1.7 Modelos <i>in vitro</i>	12
1.2 Función mitocondrial.....	14
1.2.1 Aspectos generales de la mitocondria.....	14
1.2.2 Importancia de la mitocondria en el metabolismo celular.....	16
1.2.3 Respiración mitocondrial.....	19
1.2.4 ROS mitocondrial.....	21
1.3 Estrés oxidativo por la presencia de altos niveles de H ₂ O ₂	22
1.4 Planteamiento del problema.....	24
2.0 Objetivo.....	25
2.1 Objetivos particulares.....	25
3.0 Materiales y métodos.....	26
3.1.1 Aislamiento de las mitocondrias.....	26
3.1.2 Exposición de las mitocondrias a NPs-TiO ₂ y H ₂ O ₂	26
3.2 Determinación del control respiratorio.....	27
3.4 Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	27
3.5 Características de la línea celular de epitelio de pulmón (A549).....	28
3.5.1 Exposición de células epiteliales de pulmón a NPs-TiO ₂ y H ₂ O ₂	28

3.6 Tinciones de organelos celulares.....	29
4.0 Resultados.....	31
4.1 Efectos de la concentración subtóxica de las NPs-TiO₂ y del H₂O₂ de la función mitocondrial	32
4.1 Efectos de la concentración subtóxica de las NPs-TiO₂ y del H₂O₂ sobre el control respiratorio.....	32
4.1.2 Efectos de la concentración subtóxica de las NPs-TiO₂ y del H₂O₂ sobre el sobre la PO.....	32
4.1.3 Efectos de la concentración subtóxica de las NPs-TiO₂ y del H₂O₂ sobre el sobre la fase lag.....	33
4.1.4 Efectos de la concentración subtóxica de las NPs-TiO₂ y del H₂O₂ sobre la repolarización de la membrana mitocondrial.....	34
4.1. Efectos de la concentración subtóxica de las NPs-TiO₂ y del H₂O₂ sobre el potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$).....	35
4.2 Determinación del efecto de la concentración subtóxica de las NPs-TiO₂ y H₂O₂ en el cultivo de células de células epiteliales de pulmón	39
4.2.1 Determinación de la dosis subtóxica de las NPs-TiO₂ y del H₂O₂.....	39
4.2.2 Efecto de los tratamientos de NPs-TiO₂ y H₂O₂ en la viabilidad de células epiteliales de pulmón.....	39
4.2.3 Efecto de los tratamientos de y en la conformación del citoesqueleto de actina de células epiteliales de pulmón.....	42
5.0 Discusión.....	43
6.0 Conclusión.....	49
7.0 Referencias.....	50

Introducción

1.1 Nanopartículas (NPs)

De acuerdo con la British Standards Institution y la American Society for Testing Materials, las nanopartículas (NPs) son todas aquellas partículas que miden menos de 100 nm en su tamaño aerodinámico. Las NPs pueden clasificarse de acuerdo a su origen en a) naturales, que son aquellas derivadas del polen, esporas y partículas del suelo, entre otras y b) sintéticas, que son aquellas producidas por el hombre con la finalidad de generar productos de consumo humano, entre ellas encontramos a los nanotubos de carbón, los quantum dots, los óxidos metálicos y los fulerenos. (Oberdorster 2007). La exposición del ser humano a las NPs ha incrementado drásticamente porque la producción de NPs ha incrementado rápidamente conforme se desarrolla la nanotecnología. Entre las vías de exposición a NPs para el ser humano se encuentran la inhalatoria, la gastrointestinal, la dérmica, y la vía sistémica (Oberdorser 2004). En la actualidad se sabe que cuando las NPs entran al organismo por la vía inhalatoria, son eficientemente depositadas por mecanismos de difusión en el tracto respiratorio (<http://ehp.niehs.nih.gov/members/2005>). El tamaño de las NPs facilita su entrada a las células y la transición a sistema circulatorio, donde pueden interactuar con los linfocitos y llegar al corazón. La entrada al sistema nervioso central y la acumulación a lo largo del axón de las neuronas también ha sido observada (Oberdorster., 2007).

Se sabe que las NPs tienen propiedades particulares como las mecánicas, catalíticas, ópticas y conductividad eléctrica, características que son posibles debido a su tamaño (nm) (Berube et al., 2011). La cantidad de productos que emplea la nanotecnología ha incrementado y dichos productos utilizan diferentes clases de NPs, que incluyen las que son derivados del carbón, los óxidos metálicos como el TiO_2 , los metales como el hierro, la plata y el oro y nanopolímeros como los dendrímeros (Fernandez et al., 2003). Algunos de ellos son producidos en toneladas y es probable que parte de estos nanomateriales llegue al medio ambiente, ya sea porque las fábricas los viertan a las aguas residuales o por el derrame durante el transporte y manipulación. Las NPs están

siendo utilizadas en la electrónica, neumáticos, pilas de combustible, en cuerpos de agua para remediación y en muchos otros productos, pero aún no está completamente descrita la cantidad de NPs que pueden ser emitidas al medio ambiente. Debido a que las NPs podrían convertirse en un problema serio de contaminación es importante conocer sus propiedades, los efectos en la salud y los posibles daños a los ecosistemas (Lecoanet et al. 2004).

Se conocen diferentes mecanismos por los cuales las NPs entran a las células de los organismos, lo cual puede provocar severos daños como la activación de los procesos de muerte celular (apoptosis o necrosis). Los mecanismos que las NPs utilizan para entrar en los organismos son tema de importancia para los investigadores de esta área (Roberts et al. 2007). Las NPs entran a las células a través de las membranas (Lin et al. 2007) por endocitosis (Kim et al. 2006) y adhesión (Geiser et al. 2005). En la actualidad no se conocen todos los mecanismos por medio de los cuales las NPs causan citotoxicidad a la célula, pero ya se ha probado que alteran las membranas o el potencial de membranas, oxidación de proteínas, genotoxicidad, interrupción de la transducción de la energía, formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y algunos constituyentes tóxicos, son algunos mecanismos involucrados en la toxicidad celular (Hilger et al. 2002).

1.1.2 Las NPs como contaminantes potenciales del ambiente

En el 2010 Berube et al. realizaron el estudio comparativo “Expert Delphi Survey” donde 100 expertos en el área de la nanociencia, pertenecientes a diferentes universidades del mundo e investigadores de agencias privadas de gobierno, ingenieros en toxicología ambiental y en toxicología humana. El estudio consistió en determinar las principales características de las NPs que representan un problema para la seguridad y salud ambiental, además para determinar cuáles son las principales NPs que actualmente atentan contra el ambiente (Menard et al. 2011). Los resultados de la investigación arrojan que entre las principales características por las que las NPs son un problema para el ambiente, se encuentran la densidad, la porosidad, la fibrosidad, la superficie irregular o los

defectos en la superficie, contaminantes e impurezas, entre las más importantes. El estudio muestra que las principales NPs que atentan contra el ambiente son; el fullereno, los metales (en orden de importancia: aluminio, hierro, plata, plomo y cadmio), los óxidos metálicos (siendo el dióxido de titanio el más importante del grupo) y los nanotubos de carbón. El estudio determinó que los mecanismos de toxicidad incluyen la bioacumulación, movilidad en el agua de ríos y océanos, entre los más importantes (Oberdorster et al. 2007).

1.1.3 NPs Dióxido de titanio (TiO₂)

Las NPs-TiO₂ son un compuesto metálico semiconductor con propiedades fotocatalíticas. El titanio (Ti) es el noveno elemento más abundante en la tierra, y su forma más estable es el dióxido de titanio (TiO₂). Existen tres formas estables del TiO₂: la forma rutilo (Figura 1A), la forma anatasa (Figura 2 A y Figura 3) y la forma broquita, si las formas anatasa y broquita se someten a altas temperaturas (de 400 a 1000 °C) entonces se transforman en la forma rutilo (Mendoza-Anaya et al., 2003).

En los últimos años se ha puesto interés en las reacciones que ocurren sobre la superficie iluminada de los óxidos metálicos semiconductores como el TiO₂ y el óxido de zinc (ZnO). Las NPs-TiO₂ tienen una banda moderada de energía prohibida (Gap energy: E_G) entre la banda de conducción y la banda de valencia de 3.2 eV. Si se incide un chorro de fotones mayor a 3.2 eV sobre el compuesto, los electrones de la banda de valencia se excitan y viajan a la banda de conducción, de esta manera se genera un hueco que es altamente reactivo. Generalmente la fuente de luz excitadora va de 300 a 400 nm de longitud de onda que corresponde a la luz ultravioleta (UV) (Jeng et al. 2006). Por su capacidad de generar fotorreacciones el TiO₂ es un material interesante en la industria cosmética, para ser utilizado como un repelente de los rayos UV en bloqueadores y cremas (Fernandez, 2003).

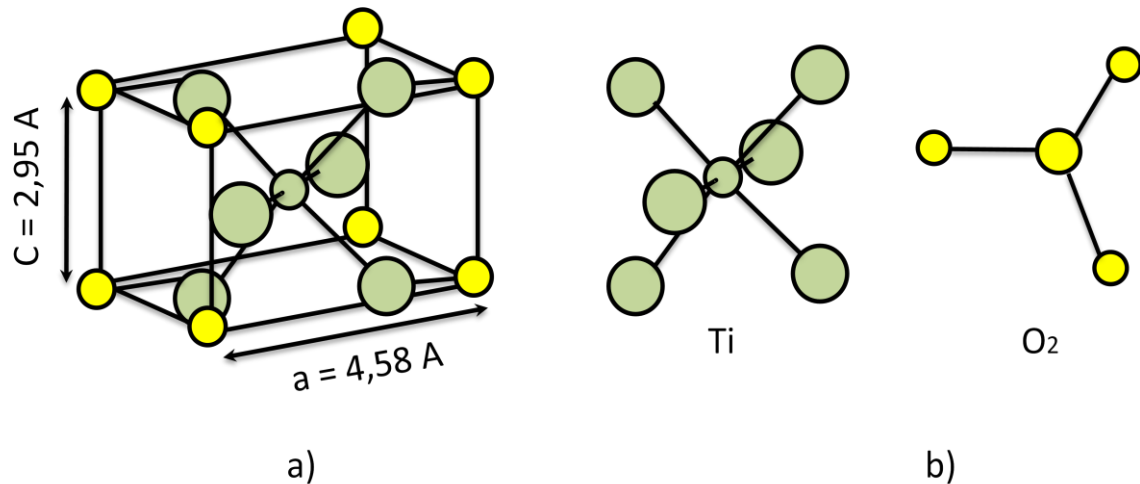


Figura 1. Estructura del rutilo. La forma del rutilo es tetragonal, a) se detalla la unidad muestra la estructura cristalográfica. b) Muestra la disposición electrónica de los átomos del TiO_2 y Oxígeno (O). El compuesto tiene una coordinación 6:3 es decir cada átomo de titanio Ti está rodeado por seis de O y cada átomo de O está rodeado por seis átomos de Ti.

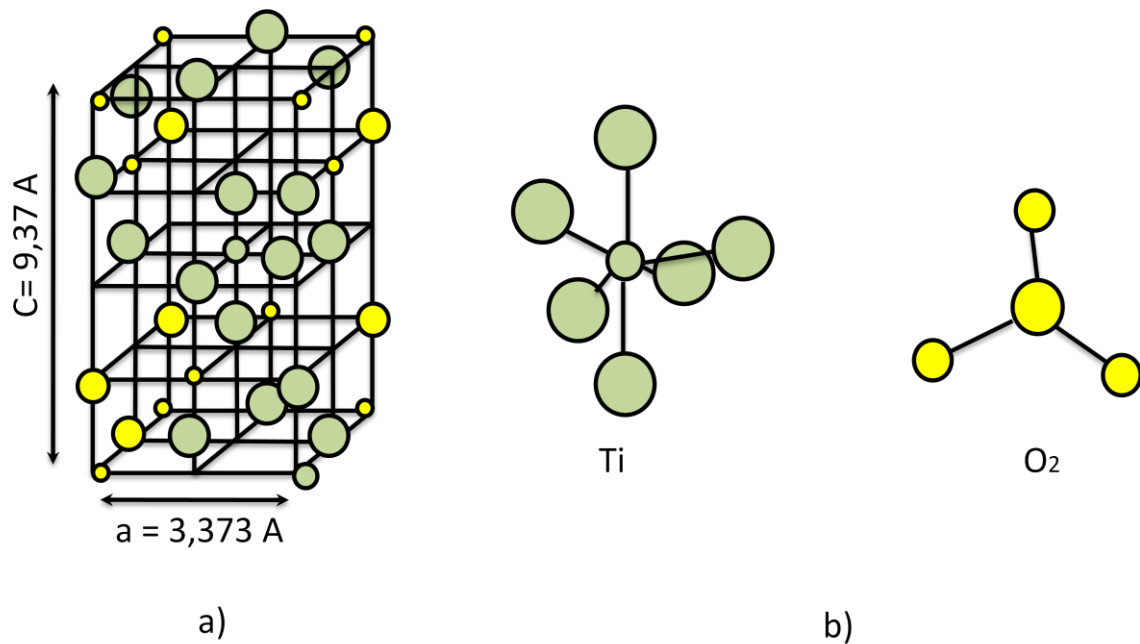


Figura 2. Estructura de la anatasa. Esta forma al igual que el rutilo es un polimorfismo de TiO_2 tetragonal, aunque la estructura anatasa es diferente cristalográficamente la figura a) es la forma rutilo también tiene coordinación 6:3 de la conformación cristalográfica. La figura b) muestra la disposición electrónica de los átomos del TiO_2 y oxígeno.

Las NPs- TiO_2 son un importante material utilizado ampliamente en la industria y al menos el 70% de la producción mundial de pinturas presenta este material, también es utilizado para producir plásticos y colorantes de comida (Jonaitis et al., 2010). Las NPs- TiO_2 son un material utilizado en la industria de cosméticos en

cremas corporales como repelente de los rayos UV (Trouiller et al. 2009). También es utilizado en diversas industrias para reforzar varillas, en biosensores, para dar blancura y quitar opacidad en papel y en implantes médicos, entre otros (Li et al 2010).

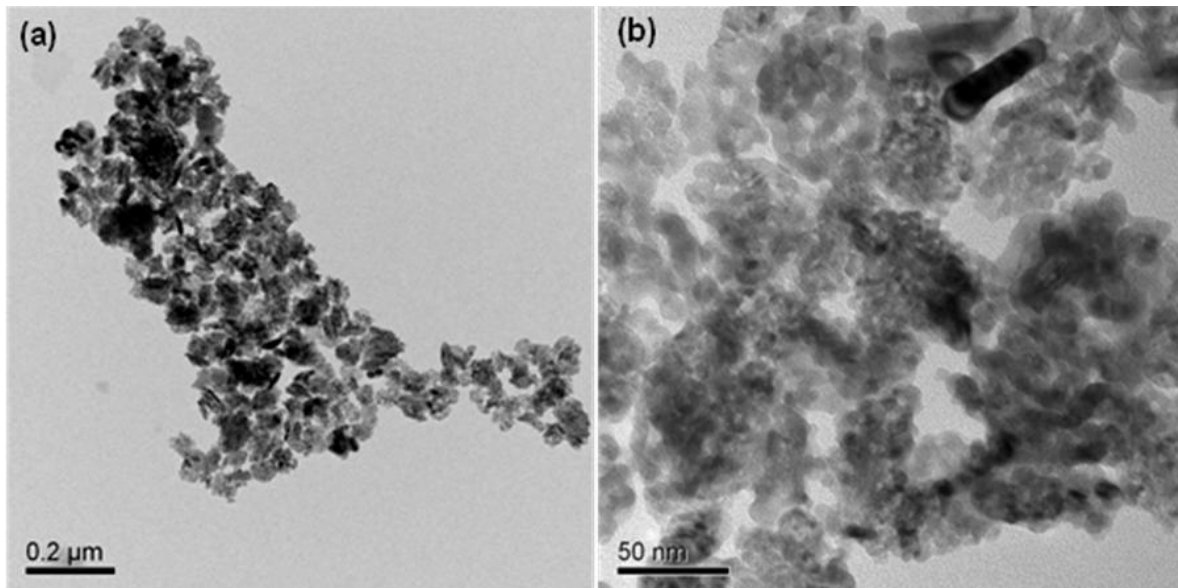


Figura 3. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión de NPs-TiO₂ en su forma cristalográfica anatasa. a) Aglomerado de NPs-TiO₂ 0.2 μm b) acercamiento (50 nm).

1.1.4 Principales vías de exposición a las NPs de TiO₂

La exposición a NPs-TiO₂ ocurre durante las horas de trabajo y mediante uso generalizado, permitiendo la entrada al cuerpo por la vía cutánea, vía gástrica y vía inhalatoria, entre las vías más comunes, convirtiéndose en un peligro latente para la salud (Zhao et al. 2009). Recientes estimaciones muestran que la producción anual a nivel mundial de NP de TiO₂ está entre 0.5-6.4 toneladas (Mueller et al 2008).

Entre los estudios para evaluar los efectos de las NPs-TiO₂ se encuentran los realizados por Bar-Ilan et al. (2011). Este grupo de investigación reportó el efecto que tienen las NPs-TiO₂ en un modelo de embrión de pez cebra. Las NPs-TiO₂ administradas absorbieron fotones que generaron pares de electrones huecos que reaccionaron con el agua y oxígeno para formar ROS, los embriones de pez cebra presentaron malformaciones y muerte pero sólo cuando el pez fue iluminado.

Pruebas *in vitro* demostraron que la generación de ROS fue dependiente a la presencia de luz (Bar-Ilan et al., 2011).

1.1.5 Efectos del TiO₂ en sistemas *in vivo* e *in vitro*

El TiO₂ se ha sido clasificado recientemente por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) en el grupo 2B de “posibles carcinógenos para humanos” (Hussain et al. 2010). Actualmente crece la evidencia de que las NPs-TiO₂ están relacionadas con problemas graves para la salud humana. La información anterior se sustenta en diferentes estudios realizados en sistemas de estudio *in vivo* (principalmente en diferentes órganos de rata) e *in vitro* (diferentes líneas celulares) que se han realizado con la finalidad de comprender el daño que provocan estas NPs.

1.1.6 Modelos *in vivo*.

En 1992 Ferin et al. realizaron experimentos con la forma cristalográfica anatasa de NPs-TiO₂ (23.5mg/m³) utilizando diferentes tamaños de NPs (21-250 nm), en un modelo de rata. Los animales estuvieron expuestos durante 12 semanas (6 h/día, 5 días a la semana) y se demostró que las partículas más tóxicas fueron las que tenían un tamaño menor a 100nm. Heirinch et al. en 1995 instilaron ratas intratraquealmente con TiO₂ (10mg/m³) (forma cristalográfica anatasa/rutilo 80:20) de 15 a 40 nm durante 2 años (18h/día). Las ratas presentaron tumores en los pulmones y ligera mortalidad comparadas con el control. En el 2004 Bermudez et al realizaron experimentos en ratas, hamsters y ratones, los cuales fueron expuestos a los diferentes concentraciones de NPs-TiO₂ (0.5, 2.0 y 10.0 mg/m³ en la forma cristalográfica de rutilo y de anatasa 80:20) de 21 nm. Los investigadores probaron que: a) el modelo de rata es más sensible que los ratones, b) el modelo de hámster el menos sensible de los tres y c) que las concentraciones de 0.5 y 2.0 mg/m³ no tiene efecto en este modelo de estudio con roedores.

En general se ha mostrado que la administración de dosis de NPs-TiO₂ vía intratraqueal en ratas provocan distintas reacciones tóxicas. Por ejemplo, en pulmones provoca respuesta inflamatoria y/o infiltración de macrófagos (Inoue et

al., 2008); daño epitelial, citotoxicidad (Renwick et al., 2004) y alteraciones en la morfología de los pulmones (Chen et al., 2006).

Chen et al. en 2009 experimentaron con las rutas de exposición oral, sanguínea y dérmica en ratas. Inyectaron intraperitonealmente NPs-TiO₂ (anatasa de 80-110 nm) en una dosis de 324-2592 mg/kg de peso. Las ratas presentaron trombosis y alta mortalidad por obstrucción de los pulmones, además, el daño sobre las ratas fue evidente en diferentes órganos como el bazo, hígado y riñones. Ninomiya et al. inyectaron 100 µg de NPs-TiO₂ suspendidas en solución salina dentro de ratas embarazadas de 6, 9, 12 y 15 días y se demostró cambio en la expresión de genes relacionados con el desarrollo y función del sistema nervioso central .

1.1.7 Modelos *in vitro*.

Trouiller et al. en el 2009 señalaron que la toxicidad de las NPs-TiO₂ se debe a su tamaño y su capacidad para generar ROS. Este grupo de investigación demostró que las NPs-TiO₂ degradan a la histona γ-H2AX y provocan delección en la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, propiedades que inducen en ratas inflamación pulmonar, además de daño en órganos como hígado y riñones. Estudios genotóxicos dan la evidencia de que las NPs-TiO₂ puede dañar DNA, manifestada en mutación de genes, daño en los cromosomas y deformación en la estructura característica del (α hélice) DNA. Shukla et al. en el 2010, expusieron células epidermales A431 a NPs-TiO₂ y observaron mediante la prueba del ensayo cometa que las NPs-TiO₂ provocan daño en el DNA además de la inducción de la formación de micro núcleos en las células.

Se han realizado estudios para determinar la respuesta inflamatoria que tiene el epitelio pulmonar cuando es expuesto a NPs-TiO₂ de diferente estructura cristalográfica (anatasa, rutilo o broquita). Estos estudios se han realizado *in vitro* utilizando diferentes líneas celulares epiteliales inmortalizadas (Hussain et al., 2009; Sayes et al., 2006; Singh et al., 2007). Los experimentos realizados en células epiteliales de pulmón (línea celular A549) y en células bronquio epiteliales transformadas por virus (BEAS-2B y 16HBE140), reportan que las NPs de TiO₂

inducen la secreción de interleucinas (IL)-1, IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). La actividad inflamatoria se le atribuye a la actividad catalítica de la forma anatasa de las NPs-TiO₂, que tienen la capacidad de generar altas niveles de ROS dentro de la células (Sayes et al. 2006).

Se han estudiado las propiedades de agregación y aglomeración que tienen las NPs-TiO₂ (forma anatasa) sobre células epiteliales de pulmón A549, ya que se sabe que el tamaño de las NPs-TiO₂ y el área superficial que ocupa son características importantes para la perspectiva toxicológica de las NPs. Singh S. et al 2007 estudiaron el efecto del tamaño de las NPs-TiO₂ en un modelo *in vitro* en células A549 (Vamanu et al. 2008). Los resultados muestran que las NPs-TiO₂ formaron agregados dentro de las células A549 de diferentes tamaños y se encontraron principalmente alrededor del núcleo. Además encontraron que las NPs-TiO₂ activaron la expresión de IL-8.

Huang S., et al. en el 2009 manifestaron que la exposición de NPs-TiO₂ aguda sobre células de fibroblasto humano NIH 3T3 y HFW potencia la proliferación, mientras que una exposición durante un tiempo largo no sólo incrementa la supervivencia, sino, que también incrementa la cantidad de células con micro núcleos.

Existe una fuerte evidencia de que el incremento de ROS intracelular es una de las vías más importantes por medio de la cual las NPs-TiO₂ tienen afecto a nivel celular (Gurr et al., 2005; Wang et al., 2007; Kang et al., 2008). El incremento de ROS promueve la activación de diferentes procesos celulares (Li et al., 2010), como la apoptosis, activación de la proliferación y la activación de promotores nucleares. Específicamente, el H₂O₂, que promueve la fosforilación, activación y oxidación de varios factores transcripcionales, como el activador de proteína 1 (AP-1), p53 y el factor inducido por hipoxia (HIF-1 α).

Zhao et al. en el 2009 señalaron que las NPs-TiO₂ inducen el incremento de ROS celular, provocando el aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Marano et al. en el 2011 indicaron además, que las ROS producidas inducen la

activación de la caspasa 8 y la inhibición de la activación de la familia de proteínas Bcl2 que regulan la integridad mitocondrial.

Hussain et al. en 2010 realizaron un estudio para determinar el efecto tóxico de NPs-TiO₂ (anatasa de 15 nm), sobre células 16HBE14o y encontraron que el tamaño de la célula disminuyó mostrando aparición de vesículas en las membranas, descompensación de la cromatina periférica, activación de caspasas, degradación del DNA y finalmente apoptosis. Por otro lado, se ha demostrado que la interacción de los NM con el DNA tiene implicaciones en la replicación y transcripción ya que las NPs-TiO₂ tiene la capacidad de genera ROS que pueden desenrollar la doble hebra del DNA (Wakefield et al. 2004).

Para conocer los efectos de la exposición a NPs-TiO₂ a nivel organelo, se han realizado diferentes estudios y entre ellos, Freyre et al. en el año 2010 determinaron el efecto de NPs-TiO₂ (anatasa 25 nm) sobre la función mitocondrial en preparaciones aisladas de pulmón de rata. Este grupo determinó que la exposición a NPs-TiO₂ induce la disminución en el control respiratorio mitocondrial, disminución del potencial de membrana mitocondrial e incremento de ROS. Debido a que la mitocondria es un organelo fundamental para el metabolismo celular y a que existe evidencia de que parte de los efectos tóxicos de las NPs-TiO₂ pueden estar mediados por alteraciones mitocondriales, a continuación se describen algunas generalidades sobre este organelo.

1.2 Función mitocondrial

1.2.1 Aspectos generales de la mitocondria

Hace millones de años la invasión de una célula primitiva sobre un simple organismo anaerobio, dio lugar a una compleja relación simbiótica que perduró y se refinó a lo largo de la evolución, permitiendo de esta forma la aparición de los complejos organismos pluricelulares (Dyall et al., 2004). La mitocondria está considerada como un simbiote dentro de una célula más compleja, que con el transcurso del tiempo, se especializó en utilizar el O₂ y moléculas con ricas en

carbonos como la glucosa, los ácidos grasos y el piruvato para proveer de energía a su hospedero (Wallace et al 2005; Mattson et al., 2008).

El tamaño y la cantidad de mitocondrias dentro de una célula es muy variable, éstos organelos tienen la capacidad de desplazarse y multiplicarse dentro de la célula (Detmer, 2007). Está bien probado que los tejidos que necesitan mayor cantidad de energía presentan una mayor proporción de mitocondrias. Se sabe que la cantidad de mitocondrias en las células puede ser de una docena hasta miles, como el caso de los ovocitos que presentan arriba de 100,000 mitocondrias (Szewczyk et al., 2002).

Éste organelo cuenta con una matriz bien delimitada, ella tiene un DNA circular: de 16.6Kb.; con 37 genes, de los cuales 2 codifican para rRNA, 22 tRNA y 13 genes que codifican para las proteínas que conforman el complejo de proteínas de la cadena transportadora de electrones (DiMauro y Schon 2010).

Debido a que la mitocondria presenta una membrana externa permeable a diferentes moléculas y una interna impermeable, la mitocondria es el único organelo capaz de generar una corriente de voltaje de 180 mV que conduce electrones generados en los procesos oxidativos del ciclo de ácido cítrico y de la β -oxidación (Szewczyk et al., 2002). Ésta corriente es conducida sobre cinco complejos proteicos (I, II, III, IV y V) que están inmersos en la membrana interna, mismos que conforman la cadena respiratoria. En el transporte de electrones el 90% del oxígeno captado por las células aerobias es reducido a agua por la citocromo oxidasa (Lin et al., 2010).

1.2.2 Importancia de la mitocondria en el metabolismo celular

La mitocondria es un organelo cuya función principal es llevar a cabo la respiración celular aeróbica, que tiene como fin la producción de energía en forma de ATP. Existen tres pasos importantes de la respiración aerobia, el primero paso es la glucólisis, el segundo el ciclo de Krebs y el tercero la fosforilación oxidativa.

En la glucólisis, moléculas de glucosa serán oxidadas hasta formar piruvato por reacciones químicas que ocurren dentro del citoplasma celular. El piruvato se

incorpora a la mitocondria por el ciclo de Krebs, el piruvato atraviesa la membrana externa mitocondrial de forma pasiva debido a la alta permeabilidad de la misma, e piruvato ingresa a la matriz mitocondrial mediante un mecanismo de simporte con protones que le permite atravesar la membrana interna de la mitocondria. Dentro de la matriz mitocondrial, el piruvato sufre una descarboxilación oxidativa en la que interviene el complejo de tres enzimas que forman la piruvato deshidrogenasa. Este complejo enzimático posee varios cofactores, entre ellos la coenzima A y es el encargado de catalizar la conversión del ácido pirúvico a acetil-CoA compuesto con el que inicia el ciclo de Krebs.

El ciclo de Krebs es un ciclo metabólico de importancia fundamental para las células aerobias que utilizan al oxígeno para los procesos respiratorios. En primer lugar, mediante este ciclo pueden obtenerse coenzimas reducidas (NADH y o FADH_2) que servirán como activadores de la cadena respiratoria para síntesis de ATP. En el Ciclo de Krebs ocurren descarboxilaciones oxidativas sucesivas efectuadas por la isocitrato deshidrogenasa y por la α -cetoglutarato deshidrogenasa, donde se liberan dos carbonos en forma de CO_2 . En las descarboxilaciones oxidativas de la isocitrato y α -cetoglutarato deshidrogenasas se reducen dos moléculas de NAD^+ y de la oxidación del succinato se reduce una molécula de FAD, en la oxidación del malato se reduce otra molécula de NAD^+ y por último se reduce otra molécula de NAD^+ en la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA. Los electrones se transfieren del NADH y FADH_2 al O_2 a través de cinco complejos proteicos presentes en la membrana interna mitocondrial (Figura 4) (Lubert Stryer pp. 513-525, 2006).

La cadena respiratoria es el tercer paso de la respiración aerobia y es el proceso por el cual la mitocondria genera un gradiente de electroquímico a través de cinco complejos mitocondriales, el complejo I NADH deshidrogenasa, complejo II succinato deshidrogenasa, el complejo III citocromo bc_1 , complejo IV citocromo oxidasa y el complejo V la ATP sintasa. Los complejos I, III y IV son capaces de generar un gradiente de protones que impulsará la síntesis de ATP por el complejo

V. El flujo de electrones termina en el complejo IV que tiene la capacidad de realizar la reducción tetravalente del oxígeno, es decir le coloca cuatro electrones al oxígeno para formar una molécula de H₂O. Es de esta forma que el oxígeno sirve como aceptor de electrones de la respiración aerobia (Lubert Stryer sexta ed. pp. 513-525.)

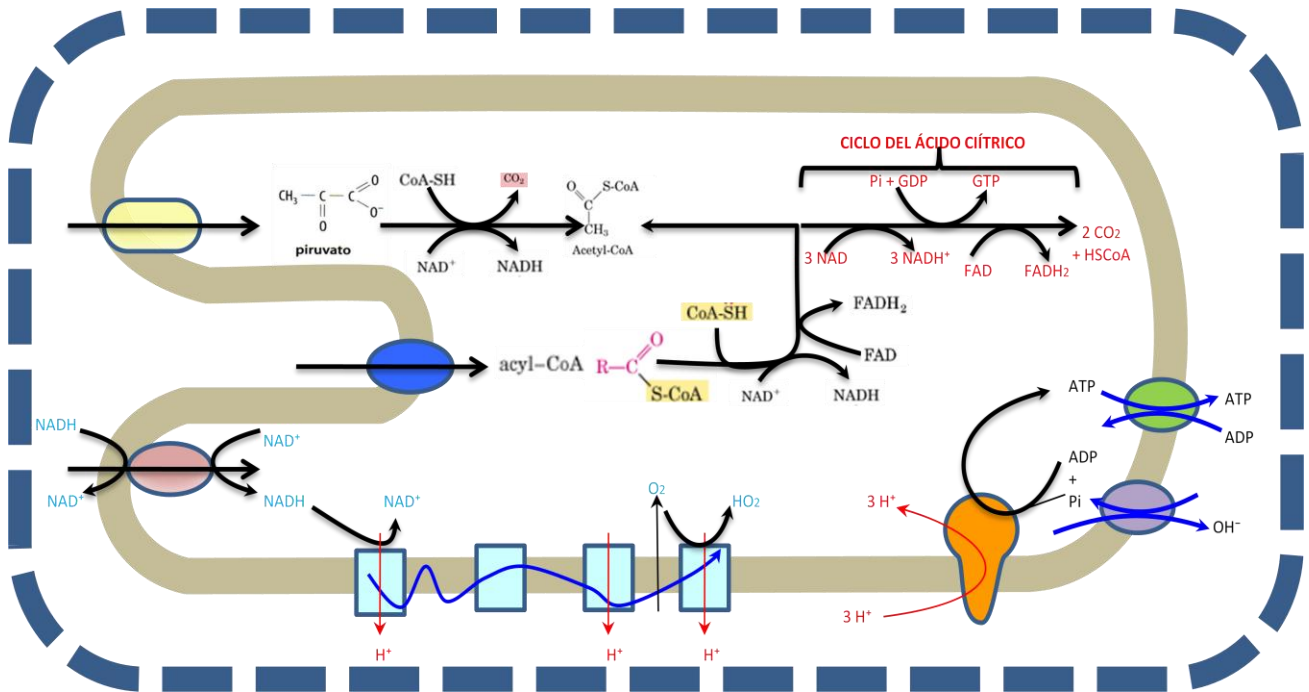


Figura 4. Función mitocondrial donde se muestra el ciclo de Krebs, la cadena respiratoria incluyendo la reducción del oxígeno a agua, la síntesis de ATP y la β oxidación Lubert Stryer pp. 513-525, 2006.

El complejo I (succinato-CoQreductasa) recibe los primeros dos electrones provenientes de la oxidación de la coenzima NADH a NAD⁺ para dar inicio al flujo de electrones de la cadena respiratoria (Figura 6 A). Los electrones provenientes de la oxido-reducción de coenzimas en el ciclo de Krebs, son transportados por la coenzima Q. La quinona o coenzima Q es capaz de viajar a través de la membrana mitocondrial, donde es reducida a QH₂ o ubiquinona. De esta forma los electrones son transportados a través de la membrana hasta el complejo III (ubiquinolcitocromo c reductasa). La cadena respiratoria también puede comenzar

en el complejo II (succinato CoQ reductasa) cuando este complejo dona electrones a la ubiquinona desde el succinato y los transfiere vía FAD a la ubiquinona (complejo III) (Figura 6 B). Una vez en el complejo III los electrones son transportados por citocromo c, que es un transportador de electrones hidrosoluble que se encuentra en el espacio intermembrana, hasta el complejo IV (citocromo c oxidasa) donde finalmente serán reducidos a agua (Figura 6 A y B), al mismo tiempo los complejos I, III y IV bombean protones al espacio intermembrana, generando de esta forma un gradiente de protones que promoverán el giro de la fracción F_0 de la ATP sintasa para la síntesis de ATP.

El complejo V o ATP sintasa utiliza la energía generada por la fuerza protón motriz de la membrana interna mitocondrial para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi. Este complejo proteico también se encuentra sobre la membrana mitocondrial interna, en el estroma del tilacoide y en la membrana plasmática de las bacterias. La ATP sintasa convierte la energía química del gradiente de protones y la transforma en energía mecánica por medio de rotación de sus subunidades y de nuevo a energía química en forma de ATP (Weber et al. 2006)

La ATP sintasa está compuesta por dos sectores multiméricos el F_0 y F_1 . El componente F_0 está inmerso en la membrana interna mitocondrial y se compone por tres tipos de subunidades proteicas (a, b, y c). El multímero F_1 está compuesto por 5 subunidades polipeptídicas distintas (β_3 , α_3 , γ , δ , y ϵ) que son solubles en agua, las subunidades α y β están unidas aleatoriamente formando un hexámero ($\beta\alpha$)₃ que reposa sobre la unidad γ , que a su vez está fijada a un anillo formado por 12 subunidades c, ensamblando una estructura giratoria que genera la síntesis de ATP (Weber y Senior, 2002; Weber et al., 2006).

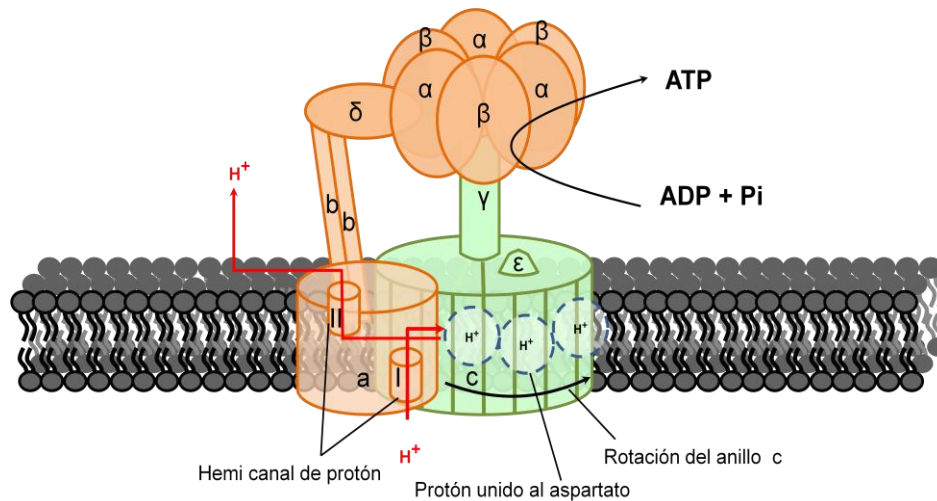


Figura 5. ATP sintetasa, complejo protéico conformado las subunidades F₁ (α, β, δ, γ, ε) y la subunidad F₀ (a, b y c) además presenta los canales I y II.

La síntesis de ATP es posible debido a que el hexámero (αβ)₃ contiene el centro de unión catalítico que es activado por la rotación del tallo giratorio (γ). La subunidades a, b y δ son la porción estática de la ATP sintetasa que sostiene a la subunidad γ (figura 5), que gira debido por la fuerza ejercida por el gradiente de protones sobre el anillo polimérico c con quien está anclada. Se estima que la fuerza producida por el gradiente de protones y que mueve a la ATP sintetasa es de 50kJ/mol (Weber et al., 2003; Weber et al., 2006).

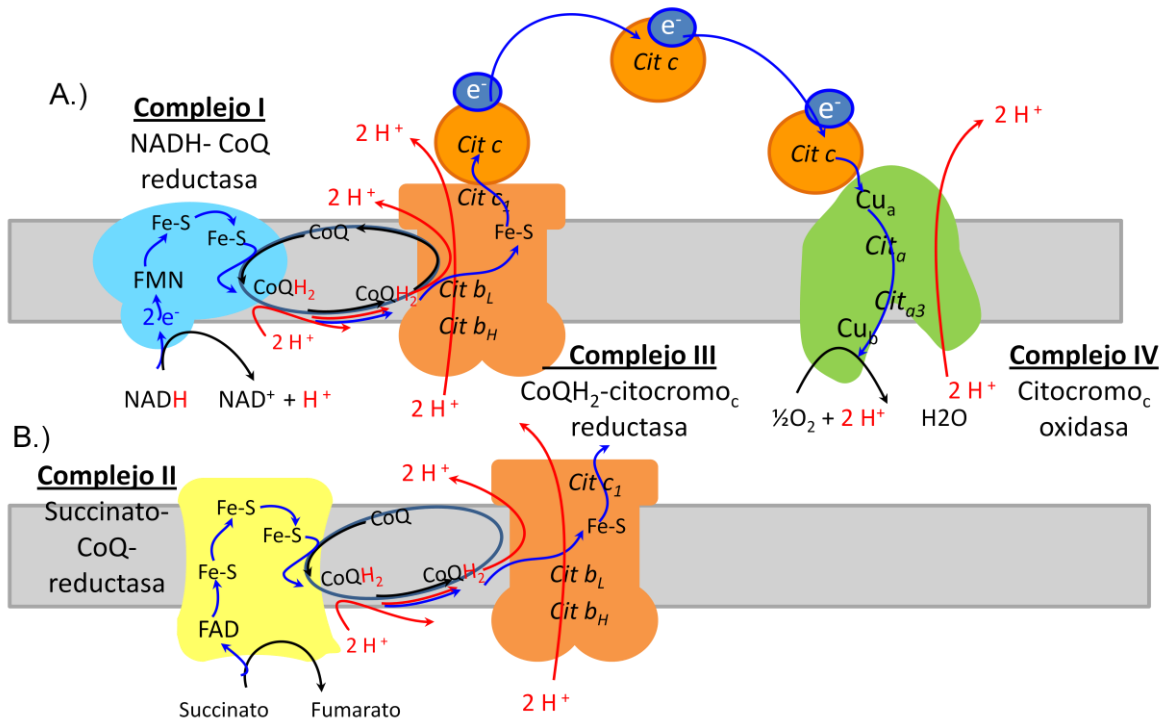


Figura 6. Cadena respiratoria mitocondrial. Se muestran los complejos mitocondriales complejo I o NADH deshidrogenasa (azul), complejo II o succinato CoQ reductasa (amarillo), complejo III o ubiquinolcitocromo c reductasa (anaranjado) y complejo IV c oxidasa (verde). Las flechas azules indican el flujo de electrones y las flechas rojas el bombeo de protones por cada complejo al espacio intermembranal.

1.2.3 Respiración mitocondrial

El control respiratorio se define como la capacidad que tiene la mitocondria para regular la velocidad apropiada para el transporte de electrones en ausencia de ADP. Para que las mitocondrias se mantengan en un estado óptimo dentro de la célula, es necesario que mantenga un balance energético, que es regulado por cambios en la actividad de varios de los sustratos de deshidrogenasas o sustratos oxidativos. La transferencia de electrones por las proteínas de transporte de la membrana interna y la síntesis de ADP, ésta última toma una gran importancia ya que, puede ejercer un control predominante en la respiración, razón por la cual, es utilizado para regular la respiración de mitocondrias aisladas (Toth et al., 1989). El buen funcionamiento de la respiración mitocondrial, o el amplio intervalo del control respiratorio aseguran una buena respuesta a cambios que puedan ocurrir en el transporte de metabolitos, potencial termodinámico y actividad de las enzimas que generan las descarboxilaciones que impulsan la respiración

mitocondrial. Otro parámetro importante para determinar la función mitocondrial es la fase lag, que se define como el tiempo que tarda la mitocondria en consumir oxígeno o el tiempo que tarda la mitocondria en fosforilar el ADP, si se afecta la función mitocondrial normal, entonteces se modifica la fase lag.

Se denomina estado III (estado 3) a la velocidad de consumo de oxígeno (o velocidad de oxidación durante la síntesis de ATP) en presencia de los sustratos (malato, glutamato o succinato) de las enzimas de la cadena respiratoria y de ADP. Al cambio de la velocidad de consumo de oxígeno por ausencia de ADP se le denomina estad IV (estado 4) (Toth et al., 1990). La figura 7 muestra un trazo típico del consumo de oxígeno cuando se adicionan los sustratos y ADP a mitocondrias aisladas.

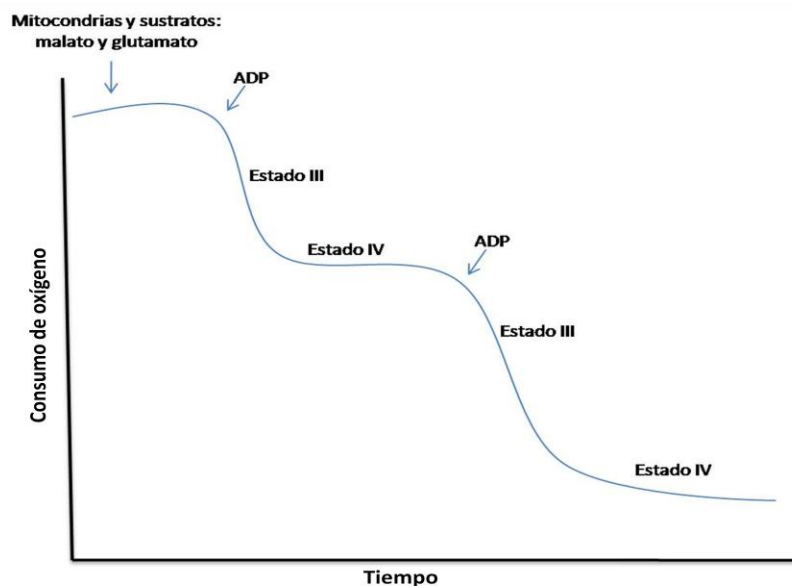


Figura 7. Gráfica de consumo de oxígeno. Se muestra los estados III y IV que cambian cuando las mitocondrias son estimuladas con ADP.

La respiración mitocondrial puede sufrir desacoplamiento por dos mecanismos. El primer mecanismo impide la respiración mitocondrial debido a que la membrana interna de la mitocondria se vuelve permeable a protones, mismos que escapan de gradiente de protones, impidiendo de esta forma la síntesis de ATP. El segundo propone que la fracción F_0 de la ATP sintasa se inhibe, y aunque haya flujo de electrones y bombeo por protones en la cadena respiratoria, los protones no son capaces de hacer girar la fracción F_0 y como consecuencia el ATP no es liberado

por la fracción F_1 . Existen diferentes sustancias que al interactuar con las proteínas de la cadena respiratoria interfieren con el control respiratorio, por ejemplo la oligomicina, es un inhibidor (o bloqueador) del canal de protones en la fracción F_0 de la ATP sintasa que es utilizada en diferentes trabajos para determinar el óptimo funcionamiento de la mitocondria, ya que mediante este mecanismo inhibe la fosforilación oxidativa y no tiene efectos directos sobre la cadena de transporte de electrones o del gradiente quimiosmótico. Un importante desacoplante de la cadena respiratoria es el CCCP (carbonil-cianuro-m-clorofenilhidrazona), compuesto perteneciente al grupo de los ionoforos que afecta la permeabilidad de la membrana provocando el desacoplamiento del transporte de electrones. La eficiencia con la cual la mitocondria traduce la energía redox libre en ATP es medida por la P/O, que se define como el cociente de los nanomoles de ADP fosforilado (a una preparación de mitocondrias) por cada átomo de O consumido (Toth et al., 1990).

1.2.4 ROS mitocondrial

La mitocondria por su importante función en el metabolismo aerobio genera ROS en las células de mamíferos y se estima que el 4-5% del O_2 consumido en las reacciones aerobias es convertido en ROS (Klaunig y Kamendulis 2004). La formación de ROS se debe a que los electrones escapan de la cadena transportadora de electrones y reaccionan con el O_2 (un punto clave de escape de electrones es en la coenzima Q que es un aceptor de electrones del complejo I y II), del origen de esta reacción se genera anión súper óxido ($O_2^{\cdot-}$), que será transformado a H_2O_2 por la acción de la súper óxido dismutasa (SOD). En la actualidad se conocen dentro de la mitocondria 9 posibles generadores de ROS, los mejores descritos son el complejo I y el complejo III. En el complejo I se genera $O_2^{\cdot-}$ y aunque en menor producción algunas otras especies reactivas, y es considerado el sitio fisiológico dentro de la mitocondria de mayor producción de ROS (Murphy 2009).

Se ha propuesto que las ROS generadas por la mitocondria funcionan como iniciadores de rutas de señalización, donde la mitocondria promueve cambios en

la expresión de genes nucleares que regulan la expresión de proteínas como C-Jun NH₂-terminal kinasa, (JNK), cinasa p58 y ERK (Guyton et al. 1996). Se ha estudiado el efecto que tienen el O⁻ y el H₂O₂ provenientes de la mitocondria sobre diferentes tipos celulares y se ha encontrado que bajas concentraciones de ROS estimulan el crecimiento de células humanas como los fibroblastos (Day y Suzuki 2005). El mecanismo por el cual el H₂O₂ activa la proliferación celular se debe a la interacción de factores de crecimiento con receptores membranales. La interacción del H₂O₂ con la tirosin cinasa activa a las proteínas de MAPK (por sus siglas en inglés Mitogen-activated protein kinases) quien a su vez activará otras proteínas que están directamente relacionadas con el control proliferativo. (Wagner y Nebreda, 2009).

1.3 Estrés oxidativo por la presencia de altos niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El H₂O₂ es un compuesto químico con características de un líquido altamente polar, fuertemente enlazado con el hidrógeno tal como el agua, que por lo general se presenta como un líquido ligeramente más viscoso que éste. Es conocido por ser un poderoso oxidante.

Existen diferentes tipos de ROS como el hidroxilo (OH), el anión súper óxido (O⁻) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), cuando el H₂O₂ en la célula se genera un estado de estrés particular, mismo que está implicado en procesos inflamatorios y en enfermedades como degeneración neuronal, cáncer en diferentes tejidos y enfermedades crónicas de obstrucción (Dekhuijzen et al., 1996) pulmonar siendo el efisema pulmonar el caso más representativo de este tipo de enfermedades (White et al., 1985). El daño generado dentro de la células por la formación de ROS induce muerte celular por apoptosis o en el caso contrario puede inducir el descontrol del ciclo celular y provocar la proliferación de la célula de una manera descontrolada. Los estudios realizados para determinar el efecto del H₂O₂ en células epiteliales de pulmón muestran que el compuesto puede indirectamente activar rutas de señalización de gran importancia dentro de la célula (Smit-de Vries et al., 2007).

1.4 Planteamiento del problema

En la actualidad ya se conocen muchas de las propiedades tóxicas de las NPs-TiO₂ en pulmones cuando estas son ingeridas por la vía inhalatoria. Para determinar estas propiedades, en la mayoría de las investigaciones se han utilizado concentraciones elevadas de NPs-TiO₂ que van desde los 500 µg/cm³ hasta los 10 mg/cm³ (Christensen et al., 2011). La presente tesis tiene la finalidad de demostrar que la exposición a concentraciones muy bajas de NPs-TiO₂ predispone a adquirir daños posteriores. La predisposición al daño mitocondrial y a alteraciones en la organización del citoesqueleto debido a la exposición a NPs-TiO₂ será evidente cuando las mitocondrias y las células de epitelio pulmonar sean sometidas a un reto oxidante. En este trabajo se utilizó H₂O₂ (Smit-de Vries et al., 2007) como reto oxidante porque es una molécula que se genera en concentraciones del orden milimolar en procesos inflamatorios, simples o crónicos. La importancia de estudiar a la mitocondria se debe a que es un organelo que regula importantes rutas metabólicas dentro de la célula y a que se ha demostrado que su función se ve afectada cuando se encuentra en contacto directo con las NPs-TiO₂ (Freyre et al., 2011).

2.0 Objetivo

Determinar el efecto subtóxico de las NPs-TiO₂ frente a un reto oxidante de H₂O₂ sobre la función mitocondrial de pulmón de rata y en la conformación del citoesqueleto de células epiteliales de pulmón.

2.1. Objetivos particulares

- Se aislaron mitocondrias de pulmón de rata a quienes se les determinó la concentración de proteína, para posteriormente exponerlas a las concentraciones subtóxicas de NPs-TiO₂ (0.5 µg/mg durante 1 h) y de H₂O₂ (0.5 µM durante 30 min).

- Se determinaron los siguientes parámetros de la función mitocondrial después de ser expuestas a NPs-TiO₂ (0.5 µg/mg durante 1 h) y a H₂O₂ (0.5 µM durante 30 min): la fase lag, la repolarización de la membrana mitocondrial, el control respiratorio, el valor de la relación P/O con oximetrías y el potencial de membrana mitocondrial con ayuda de rodamina123.
- Se cultivaron células epiteliales con quienes se determinó las dosis subtóxicas de las NPs-TiO₂ y del H₂O₂. Posteriormente se determinó la viabilidad celular con las concentraciones subtóxicas de NPs-TiO₂ 5 µg/cm² y H₂O₂ 0.5 mM.
- Se verificó el estado de los núcleos de las células epiteliales de pulmón después de ser expuestas a los tratamientos NPs-TiO₂ 5 µg/cm² y H₂O₂ 0.5 mM con el colorante de Hoescht.
- Se verificó el estado del citoesqueleto de actina de células epiteliales de pulmón después de exponerlas a los tratamientos NPs-TiO₂ 5 µg/cm² y H₂O₂ 0.5 mM.

3.0 Materiales y métodos

3.1 Aislamiento de las mitocondrias

Se obtuvieron los pulmones de ratas macho Wistar de 220-250 g. Se colocaron los pulmones en solución salina al 0.9% y se pesaron. El peso de los pulmones se multiplicó por tres, el valor resultante corresponde a la cantidad de volumen de medio de homogenización (manitol 0.3 M, EDTA 2mM, DTT 1mM, PVP 40 % y albúmina de suero bovino (BSA) 0.1 %) que se les agregó. Una vez en el medio de homogenización se les colocó el inhibidor de proteasas al 2%. Los pulmones se cortaron y maceraron a 4°C, se filtró el homogeneizado y se ajustó el pH a 7.4 con cristales de trizma base. Se centrifugó a 6,000xg durante 10 min a 4°C. Posteriormente se removió la capa de lípidos y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante se centrifugó a 15,000xg durante 10 min a 4°C, se recuperó la pastilla y se suspendió en el medio de lavado frío, para nuevamente ser centrifugada a 12,000xg durante 10 min a 4°C. Se recuperó la pastilla que contiene la fracción mitocondrial y se resuspendió en 2000 µl de medio de lavado (manitol 0.3M, EDTA 1mM y BSA 0.1%).

3.1.1 Cuantificación de la proteína mitocondrial (Lowry)

Para la cuantificación de proteínas se preparó una muestra problema que fue interpolada en una curva patrón construida a partir de BSA (2mg/ml), los valores de la muestra patrón se determinaron por la interpolación de los valores de absorbancia en la curva patrón.

3.1.2 Exposición de mitocondrias de pulmón a nanopartículas de NPs-TiO₂

Una vez obtenidas las mitocondrias, se expuso 1 mg de proteína mitocondrial a los siguientes tratamientos:

- a) Control.
- b) NPs-TiO₂ 5 µg/mg de proteína durante 1 h.
- c) H₂O₂ 5 µM durante 30 min.
- d) NPs-TiO₂ 5 µg/mg + H₂O₂ 5 µM 1 h y 30 min respectivamente.

3.2 Determinación del control respiratorio

El consumo de oxígeno se determinó con un electrodo **Clark** conectado a una cámara con agitación magnética y 1 mg de proteína de mitocondrias aisladas en 1 ml. El estado IV de la respiración mitocondrial se evaluó en presencia de sustratos energizantes: glutamato (1 M) y malato (1 M). Para determinar el valor del estado III se agregó 2 μ l ADP (59.67 mM) y se cuantificó la cantidad de nanomoles de oxígeno que se consumieron por cada nanomol de ADP adicionado. Se calculó el control respiratorio con base al cociente de las pendientes obtenidas de los trazos del oxímetro de los estados III y IV.

3.4 Medición del potencial de membrana mitocondrial.

Mitocondrias de pulmón de rata (1 mg/ml) fueron fijadas con 1ml de formaldehído al 10% con PBS 1X durante 1h. Las muestras previamente fijadas se centrifugaron a 12000xg durante 5 minutos. El botón resultante se lavó con PBS 1X cinco veces y dos veces con agua destilada. A la muestra lavada se le agregó rodamina 123 (2mM) y se incubó durante 45 minutos a 37°C en oscuridad. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 12,000xg durante 5 minutos y se resuspendieron en cinco veces en PBS para lavarlas. Las mitocondrias lavadas se mantuvieron en oscuridad. Las mitocondrias se colocaron en portaobjetos con glicerol-PBS (1:3 partes) en portaobjetos, posteriormente se sellaron con un cubreobjetos. Las mitocondrias fijadas se analizaron mediante microscopía confocal.

3.4.1 Colorante fluorescente rodamina 123

Las mitocondrias aisladas de pulmón de rata (1 mg/ml) fueron tratadas de la siguiente forma: se hicieron alícuotas a las que se les agregaron NPs-TiO₂ 5 μ g/mg durante 1h; H₂O₂ 5 μ M durante 30 min; NPs-TiO₂+H₂O₂ (5 μ g/ml y 5 μ M), además de un control sin tratamiento. A los tratamientos se les agregaron los siguientes sustratos; malato (1 mM) y glutamato (1 mM) dejándolas durante 5 min,

posteriormente se les agregó ADP dejándolas incubar durante 5 min y después se incubaron con oligomicina (130 μ M) y CCCP (1 mM) para ambos sustratos el tiempo de incubación fue también de 5 min.

Las alícuotas de los tratamientos fueron subdivididos para ser fijadas según la adición de los sustratos e inhibidores siguientes:

- 1) Sustratos: malato y glutamato (
- 2) ADP
- 3) Inhibidor de la síntesis de ATP: Oligomicina
- 4) Desacoplante: CCCP

Las alícuotas fueron fijadas con formaldehído al 10% en PBS. Posteriormente se lavó el formaldehido centrifugando a 12,000xg y agregando PBS. Después de ser fijadas se les agregó el colorantes mitocondrial rodamina 123 (2 mM) el cual fue retirado con cinco lavadas con PBS y dos de H₂O destilada.

3.5 Características de la línea celular de epitelio de pulmón (A549)

Estas células son de adenocarcinoma de epitelio alveolar de pulmón. Fueron tomadas para ser comercializadas de un varón humano caucásico de 58 años. Se utilizaron por primera vez en el año de 1972 por Giard (Giard et al. 1973). Son células que generalmente presentan de 64 a 67 cromosomas, generalmente el 24 % presentan 66 cromosomas, el 22% pueden presentar 64, 65 y 67 cromosomas, el 0.4% son células haploides. La mayoría de estas células presentan dos cromosomas X y dos Y que generalmente son inservibles. En los últimos años, esta línea celular se ha estudiado intensamente y se conoce que expresa genes para mucinas respiratorias humanas, para la proteína p53, citoqueratinas, sitios de unión para estrógenos tipo I y II y otros antígenos (Cagliada et al., 2008).

3.5.1 Exposición de las células epiteliales de pulmón a NPs-TiO₂.

Las células epiteliales de pulmón fueron sembradas en cajas de 75 cm², se mantuvieron en medio **F12K** con 10% de suero fetal bovinos y 1% de antibiótico

(penicilina/estreptomicina). Se despegaron de la caja de 75 cm² utilizando tripsina EDTA 0.05%, se centrifugaron y se sembraron 10,000 células en cada uno de los de 96 pozos que conforman las placas. Los tratamientos a los que se sometieron las células fueron los siguientes:

- a) Control.
- b) NPs-TiO₂ 5 µg/cm² durante 24 h.
- c) H₂O₂ 0.5 mM 18 h.
- d) NPs-TiO₂ (5 µg/cm²) durante 24 h y posteriormente H₂O₂ (0.5 mM) durante 18 h.

Posterior a los tratamientos, se evaluó la viabilidad celular con el compuesto metil tiazol tetrazolio ó (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil tetrazolio bromuro (MTT). El color marcado en cada pozo se leyó a 540 nm en un lector de **ELISA**.

3.6 Tinciones de Hoescht, mitotraker y faloidina rodaminada

Se sembraron 400,000 células epiteliales de pulmón A549 en placas de 8.55cm² sobre un cubreobjetos. Las células fueron expuestas durante 24 h a los siguientes tratamientos:

- a) Control.
- b) NPs-TiO₂ 5 µg/cm² durante 24 h.
- c) H₂O₂ 0.5 mM 18 h.
- d) NPs-TiO₂ (5 µg/cm²) durante 24 h y posteriormente H₂O₂ (0.5 mM) durante 18 h.

Después del tiempo de exposición a los tratamientos, las células fueron fijadas con formaldehído-PBS al 10% durante 1h a 37°C. Se les colocaron los siguientes colorantes: Hoescht y rodamina 123 (2 mM). Se colocó 250µl de la solución de colorantes y se incubó durante 1h a 37°C en oscuridad. Posteriormente se lavó el colorante de las células nueve veces con PBS. Se retiró el cubre objetos de la placa y se le agregó formol al 10% en PBS para posteriormente ser montados en un porta objetos que se selló con resina. Las células fueron analizadas en el microscopio confocal.

4.0 Resultados

4.1 Determinación de la función mitocondrial

4.1.1 Efectos de la concentración subtóxica de las NPs-TiO₂ y del H₂O₂ sobre el control respiratorio

El control respiratorio nos indica la tasa de entre la respiración al adicionar ADP y sin ADP, indicando que tan acopladas están las mitocondrias. En el IV la cadena respiratoria se encuentra consumiendo muy poco oxígeno, en este estado se le agregan los sustratos energéticos malato y glutamato. La presencia de ADP estimula el consumo de oxígeno en la cadena respiratoria y también la síntesis de ATP por el complejo V. A la aceleración del consumo de oxígeno y al cambio de pendiente se le denomina estado III. Una vez que el ADP se ha terminado por la síntesis de ATP, la pendiente del estado III regresa al estado IV, si se le agrega nuevamente ADP cambiará al estado III (Figura 8).

En la presente tesis demostramos que la exposición de mitocondrias a NPs-TiO₂ 5µg/mg durante 1h, induce el decremento del control respiratorio hasta 25%. Las mitocondrias tratadas durante 30 min con H₂O₂ 5µM 35%, también presentaron disminución en el control respiratorio, al exponer a las mitocondrias a la combinación de los tratamientos NPs-TiO₂+H₂O₂ el control respiratorio presentó una disminución de 50% (Figura 8). Al final de cada trazo y para cada tratamiento a las mitocondrias se les agregó carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP 0.8 µM) con lo que se comprobó que las mitocondrias no estaban desacopladas, un compuesto que permeabiliza la membrana mitocondrial y permite la entrada de protones, desacoplando a la mitocondria.

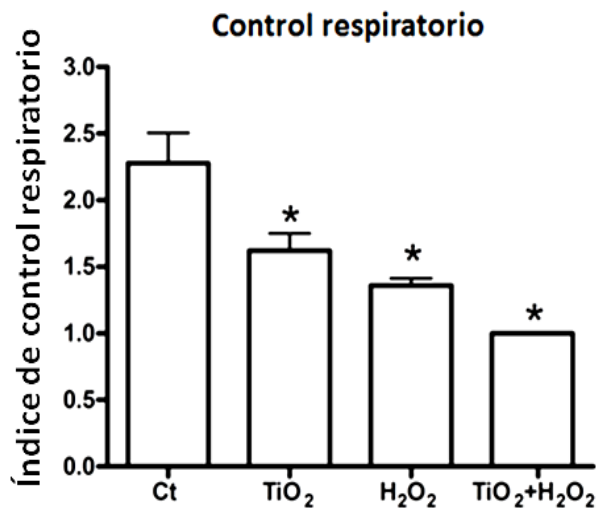


Figura 8. Control respiratorio de mitocondrias de pulmón de rata. Existe diferencia significativa entre los tratamientos el tratamiento que tuvo un efecto más evidente fue el de NPs-TiO₂+H₂O₂. *p<0.05 vs control.

4.1.2 Efectos de la concentración subtóxica de las NPs-TiO₂ y del H₂O₂ sobre la P/O.

La P/O es la cantidad de nmoles de oxígeno consumidos por nmoles de ATP sintetizado. La P/O de las mitocondrias de pulmón aisladas disminuyó significativamente cuando fueron expuestas a NPs-TiO₂ y a H₂O₂, y la combinación de los tratamientos NPs-TiO₂+H₂O₂ indujo un decremento mayor (Figura 9). El cálculo de la P/O se calcula determinando los nmoles de oxígeno que se consumen en el estado III entre la cantidad de nmoles ADP agregado.

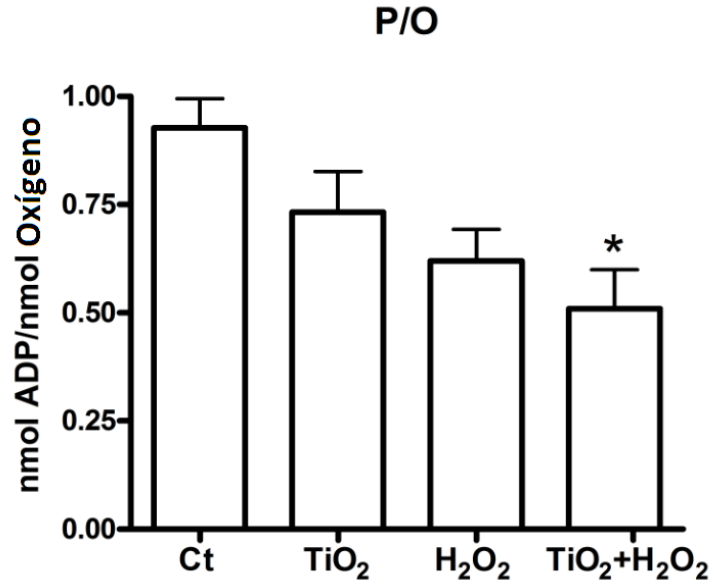


Figura 9. Gráficas que muestran el efecto de 5µg/mg de NPs-TiO₂ y 5µM de H₂O₂ sobre la P/O. Se muestra un decremento considerable en el consumo de oxígeno en las mitocondrias que fueron sometidas a la combinación de los tratamientos NPs-TiO₂ 5µg/mg+H₂O₂ 5µM. *p<0.05 vs control.

4.1.3 Efectos de la concentración subtóxica de las NPs-TiO₂ y del H₂O₂ sobre el sobre la fase lag

La fase lag es el tiempo en que se tarda la mitocondria en consumir oxígeno después de la adición de ADP. La fase lag de mitocondrias tratadas con la combinación de los tratamientos NPs-TiO₂+H₂O₂ presentó disminución significativa (Figura 10) en comparación con el resto de los tratamientos. Para este cálculo se determina el tiempo que dura el estado III este valor es el eje X en la gráfica del oxímetro.

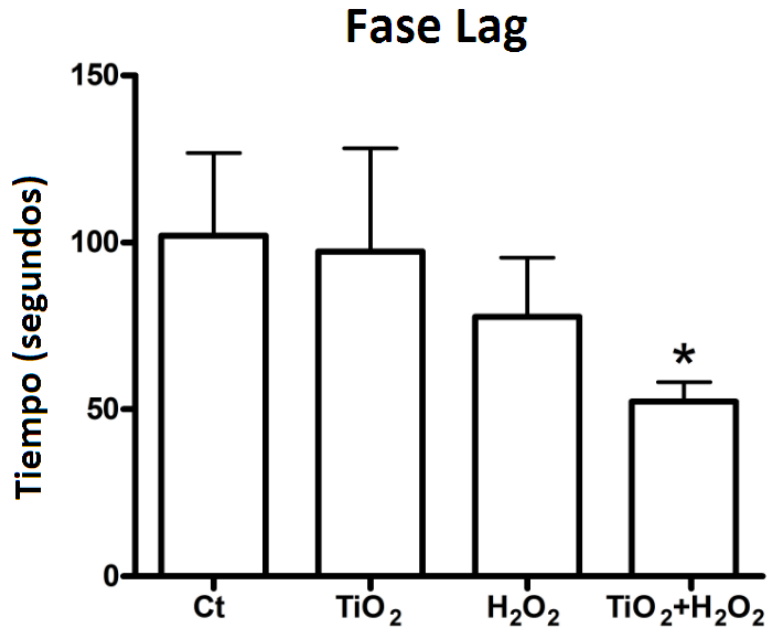


Figura 10. Gráfica que muestra el tiempo que tarda la cadena respiratoria en consumir el O₂ cuando se le adiciona el ADP (Fase lag). Las mitocondrias tratadas con 5 µg de NPs-TiO₂+5 µM de H₂O₂ tardan más tiempo en consumir O₂ que las mitocondrias del resto de los tratamientos. *p<0.05 vs control.

4.1.4 Efectos de la concentración subtóxica de las NPs-TiO₂ y del H₂O₂ sobre repolarización de la membrana mitocondrial

La repolarización de la membrana mitocondrial es el cambio de voltaje debido al consumo de oxígeno cuando se adiciona ADP a la preparación mitocondrial. La repolarización disminuyó significativamente cuando las mitocondrias fueron sometidas a la combinación de los NPs-TiO₂+H₂O₂ (Figura 11). En el resto de los tratamientos sólo se observa cambio en las mitocondria tratadas con 5 µM de H₂O₂ el resto de los tratamientos no presentaron cambio en la repolarización de membranas de mitocondrias de pulmón de rata.

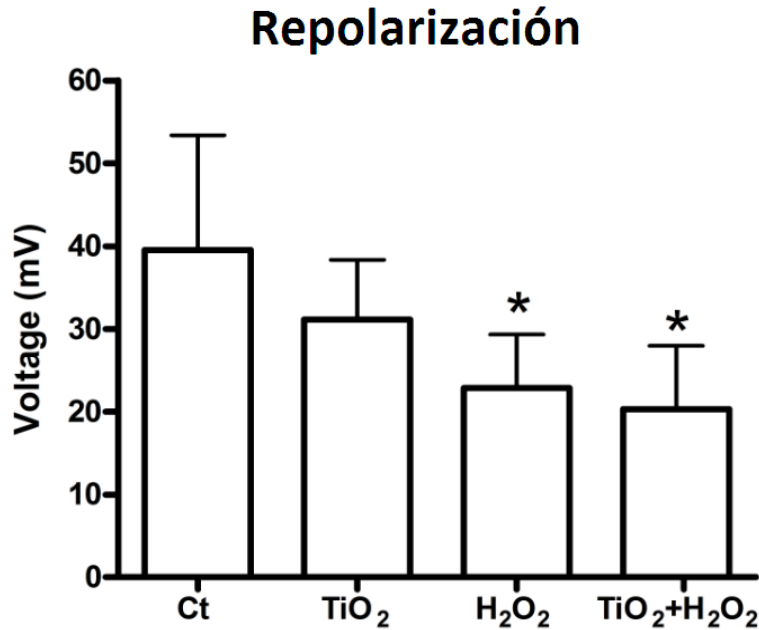


Figura 11. El voltaje de las membranas mitocondriales (repolarización). Las barras indican que la repolarización disminuye al aplicarles (5 $\mu\text{g/ml}$) de NPs-TiO₂ comparadas con las membranas del grupo control (Ct), el tratamiento con peróxido de hidrógeno (5 μM) y la combinación de los tratamientos provocan una disminución drástica en el voltaje. * $p < 0.05$ vs control.

4.1.5 Efectos de la concentración subtóxica de las NPs-TiO₂ y del H₂O₂ sobre el potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$)

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) hace referencia a la diferencia entre el voltaje de la membrana interna y la membrana externa mitocondrial y su acumulación alrededor de ésta refleja el bombeo de protones a través de la membrana interna durante el transporte de electrones en la cadena respiratoria. El $\Delta\Psi_m$ es indispensable para que se mantenga la función fisiológica de la cadena respiratoria para la formación de ATP, con la disminución del ATP disminuye la energía dentro de la célula lo que puede provocar diferentes patologías en la célula o hasta la muerte celular. Las técnicas de fluorescencia empleadas para determinar el $\Delta\Psi_m$ indican incrementando o disminución de la absorbancia de onda que es proporcional a los niveles relativos del $\Delta\Psi_m$.

El potencial de membrana en el presente trabajo fue determinado con rodamina 123, un colorante fluorescente que se une a la membrana **mitocondrial**.

La oligomicina es un inhibidor natural de la fracción F_0 de la ATP sintasa, aunque este compuesto inhibe la síntesis de ATP, si se colocan bajas concentraciones no afecta el transporte de electrones de la cadena respiratoria, pero si se utiliza una concentración elevada induce el desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones. Para determinar el efecto real de los tratamientos se determinó el valor del cociente de la intensidad de fluorescencia entre las mitocondrias tratadas únicamente con los sustratos energizantes (malato y glutamato $10 \mu\text{M}$) y las que se trataron con oligomicina ($120 \mu\text{M}$). El análisis estadístico muestra (figura 13) que el efecto más evidente de los tratamientos sobre el potencial de membrana fue la combinación de los tratamientos (NPs-TiO₂ ($5 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína y H₂O₂ $5 \mu\text{M}$, respectivamente) (Figura 12).

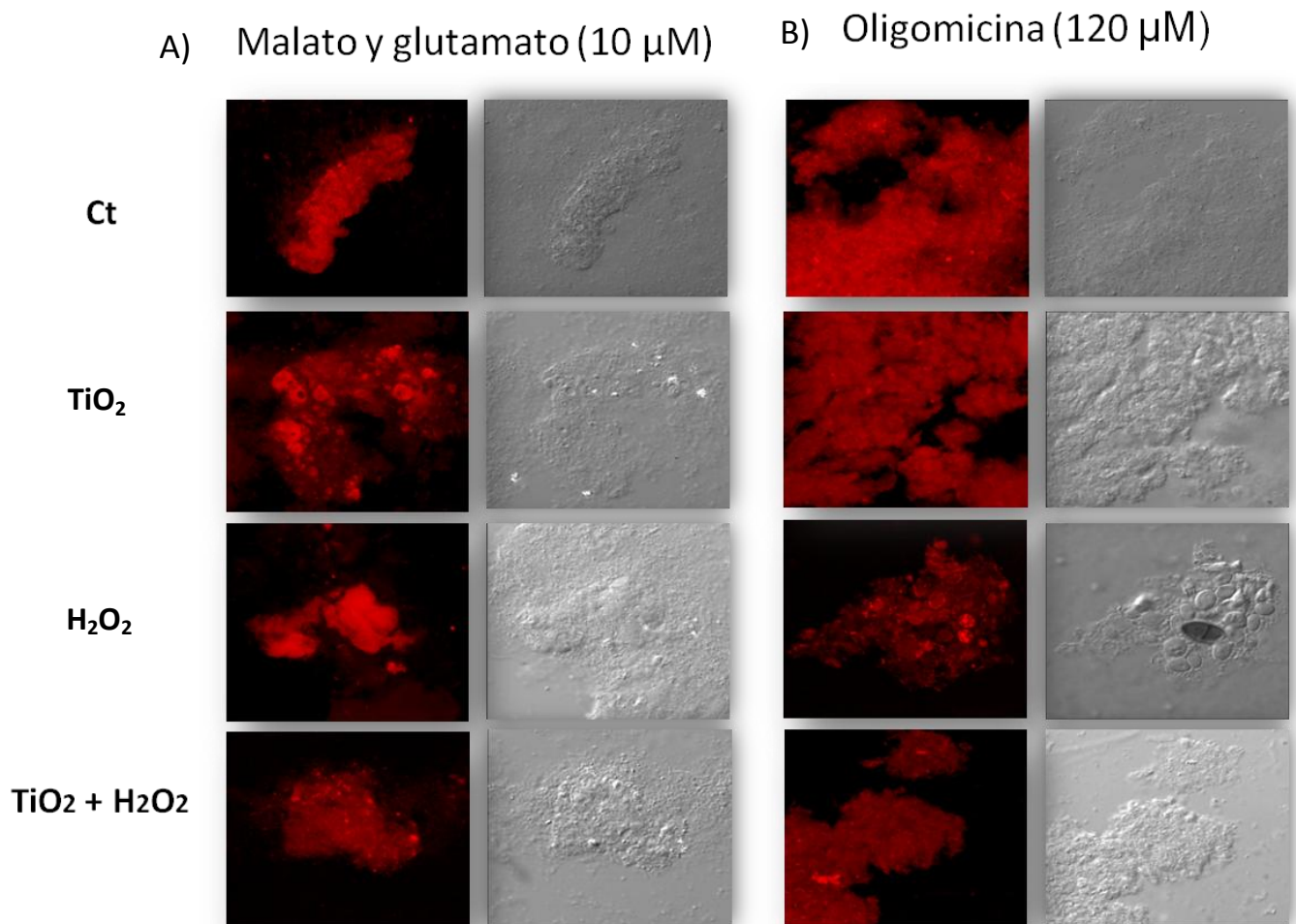


Figura 12. Potencial de membrana de mitocondrias ($\Delta\Psi_m$). 1 mg de proteína mitocondrial de pulmón de rata fue expuesto a NPs-TiO₂ (5µg/mg de proteína) durante 1 h, a H₂O₂ (5 µM) durante 30 min, la combinación de los tratamientos TiO₂+H₂O₂ (5µg/ml y 5 µM respetivamente). a) Mitocondrias a las que sólo se les agregó rodamina 123 (10 µM) y los sustratos energéticos: malato y glutamato (50 µM). B) Mitocondrias teñidas con rodamina 123 (10 µM) y oligomicina (120 µM) un inhibidor de la ATP sintasa. El potencial de membrana incrementa al aplicarle la oligomicina.

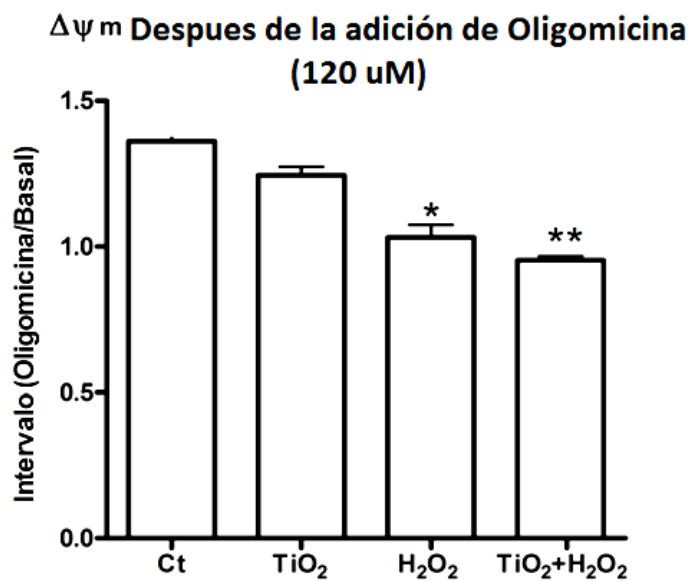


Figura 13. Cociente del ($\Delta\Psi_m$) entre mitocondrias a las que sólo se les agregó malato-glutamato (5 µM) y mitocondrias a las que se les agregó oligomicina. El $\Delta\Psi_m$ se determinó con rodamina 123 (10 µM). Las mitocondrias que fueron tratadas con H₂O₂ (5 µM) durante 30 min y las mitocondrias tratadas con TiO₂+H₂O₂ (5 µg/ml 1 h y µM 30 min respectivamente) disminuyeron significativamente la intensidad de fluorescencia (≥ 0.01) en comparación los otros tratamientos. *p<0.05 vs control; **p<0.001 vs control.

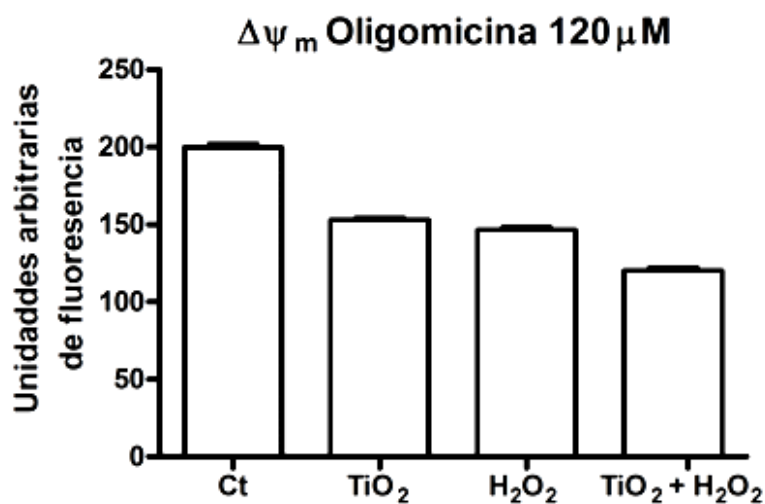


Figura 14. $\Delta\Psi_m$ de mitocondrias teñidas con rodamina 123 (10 μM). Las mitocondrias fueron tratadas con NPs-TiO₂ (5 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 h, H₂O₂ (5 μM) 30 min y la combinación de los tratamientos: NPs-TiO₂ + H₂O₂ (5 $\mu\text{g/ml}$ y 5 μM respetivamente). Adicionalmente estas mitocondrias fueron desacopladas con oligomicina (120 μM). Las barras muestran que las mitocondrias sometidas a los tratamientos disminuyeron en comparación al control.

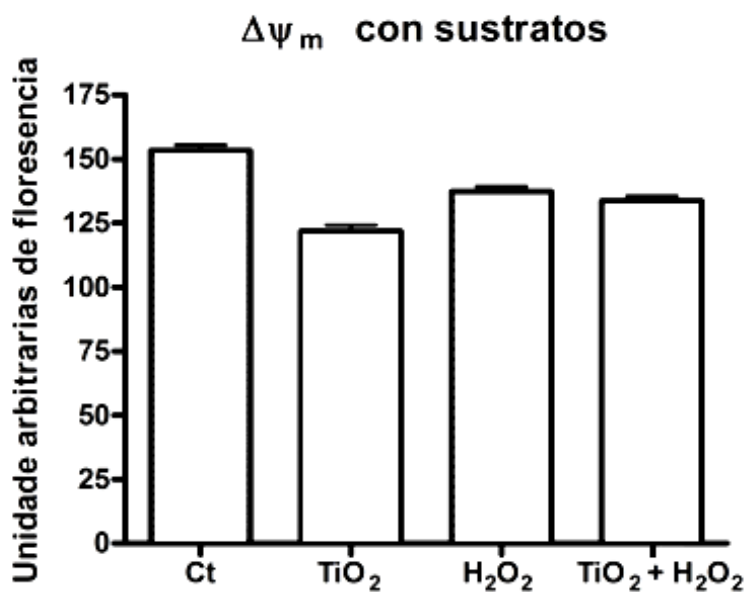


Figura 15. $\Delta\Psi_m$ de mitocondrias teñidas con rodamina 123 (10 μM) con los sustratos glutamato/malato, la barra que representa el $\Delta\Psi_m$ de mitocondrias expuestas a NPs-TiO₂ disminuye en comparación con las otras barras.

4.2 Determinación del efecto de las NPs-TiO₂ en el cultivo de de células epiteliales de pulmón

4.2.1 Determinación de la concentración subtóxica de las NPs-TiO₂ y del H₂O₂

La curva de citotoxicidad elaborada para determinar la concentración subtóxica de las NPs-TiO₂ indica que la concentración de 5 µg/cm² es la apropiada para realizar los experimentos (Figura 16 A). Las células epiteliales de pulmón cuando fueron expuestas a concentraciones de 5 a 100 µg/cm² de las NPs-TiO₂ no presentaron diferencias en la inducen modificaciones en la viabilidad.

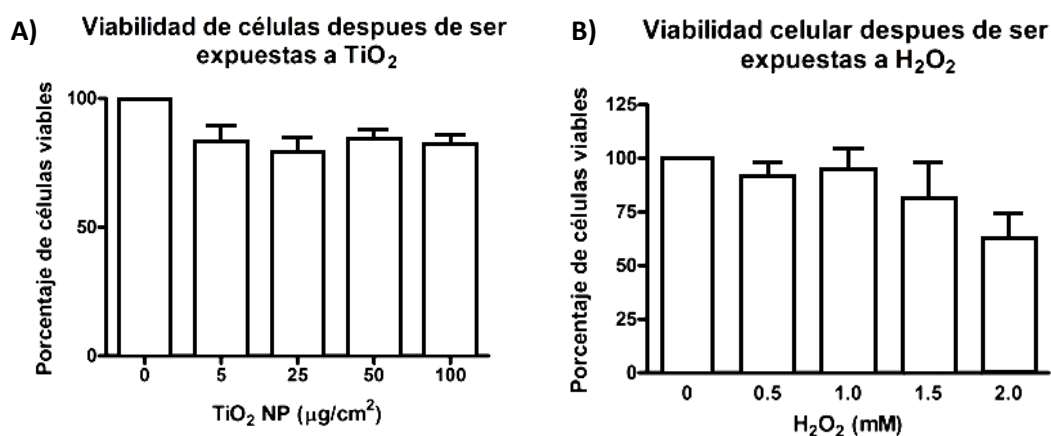


Figura 16. A) Citotoxicidad de las NPs-TiO₂ a diferentes concentraciones (de 5 a 100 µg/cm²) sobre células epiteliales de pulmón A549. La gráfica muestra el porcentaje de células viables después de ser expuestas NPs-TiO₂. B) Viabilidad de células epiteliales de pulmón A549 después de ser expuestas a diferentes concentraciones de H₂O₂ (0.5 a 2.0 mM). La gráfica muestra que las células comienzan a tener disminución en la viabilidad celular a partir de 2.0 mM.

De la misma forma se realizó una curva de citotoxicidad para determinar la concentración de H₂O₂ a utilizar en los ensayos. los datos estadísticos indican que las concentraciones de 0.5 y 1.0 mM no afectan en la viabilidad celular a concentraciones menores a 2.0 mM (Figura 16 B).

4.2.2 Efecto de los tratamientos de NPs-TiO₂ y H₂O₂ en la viabilidad de células epiteliales de pulmón.

La tinción de Hoechst que es un colorante fluorescente (que se excita a 350 nm y emite fluorescencia azul) se utiliza en microscopia confocal para visualizar los núcleos de células, dicho colorante nos permitió determinar si las células a pesar

del tratamiento se encuentran en un estado de replicación. Las micrografías tomadas (Figura 17) con el microscopio confocal muestran que hay más núcleos replicándose en las células tratadas con NPs-TiO₂ 5 µg/cm²+H₂O₂ 5 mM que en los otros tratamientos.

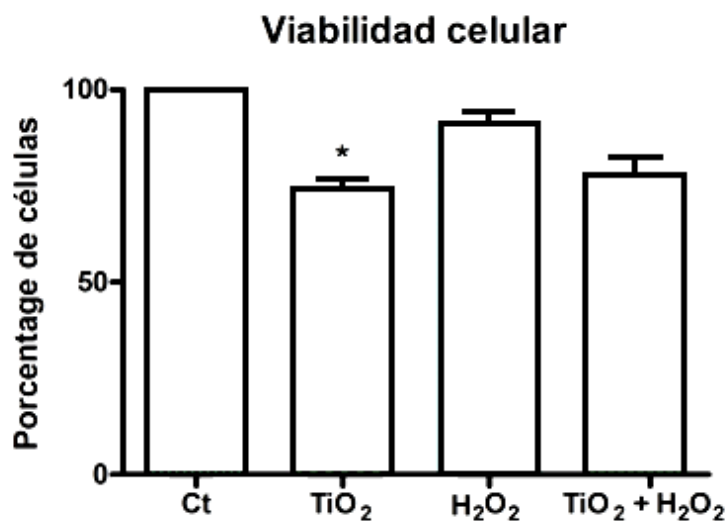


Figura 17. Viabilidad de células epiteliales de pulmón, después de ser expuestas a NPs-TiO₂ (5 µg/cm²) durante 24 h, H₂O₂ (0.5 mM) durante 18 h y la combinación de los tratamientos. Las barras representan el efecto de los tratamientos, se observa que el tratamiento que provocó la disminución de la viabilidad celular fue el tratamiento de NPs-TiO₂ (5 µg/cm²), las barra de la combinación de los tratamientos no presenta la misma tendencia estadística que presentaron los tratamientos independientemente. *p<0.05 vs control.

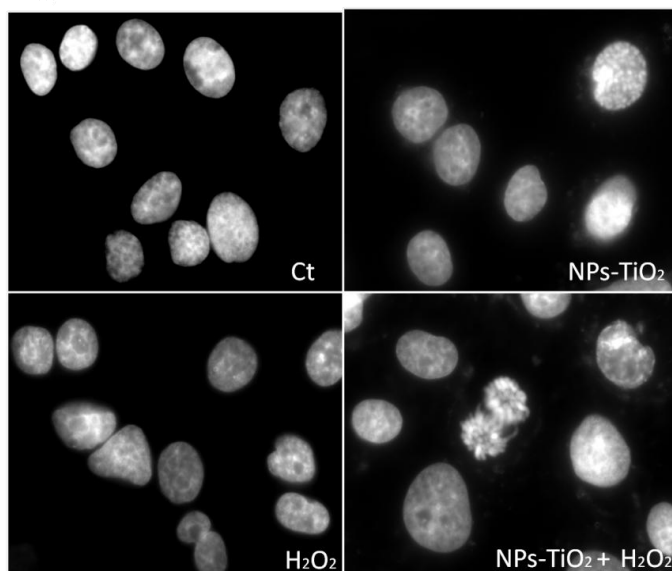


Figura 18. Núcleos de las células epiteliales de pulmón teñidos con el colorantes Hoetsch, previamente a las células se les aplicaron los tratamientos: NPs-TiO₂ (5 µg/cm²) durante 24 h, H₂O₂

(0.5 mM) durante 18 h y la combinación de los tratamientos. Las mitocondrias que fueron tratadas con NPs-TiO₂ (5 µg/cm²).

El resultado de la viabilidad celular muestra que el tratamiento NPs-TiO₂+H₂O₂ no presenta modificaciones en la viabilidad celular (Figura 17) aún cuando se les aplicó el reto oxidante de H₂O₂, es importante resaltar que las células se encuentran en estado mitótico (Figura 18).

4.2.3 Efecto de los tratamientos de NPs-TiO₂ y H₂O₂ en la conformación del citoesqueleto de actina de células epiteliales de pulmón.

La tinción de los filamentos de actina muestra que las a la células a las que se les administraron las NPs-TiO₂, tanto independientemente como la combinación del tratamiento (NPs-TiO₂ + H₂O₂) presentaron modificaciones en la conformación normal de los filamentos de actina del citoesqueleto (Figura 19). Este dato es particularmente importante porque si bien las células no están muriendo, presentan cambios conformacionales importantes en el citoesqueleto de actina.

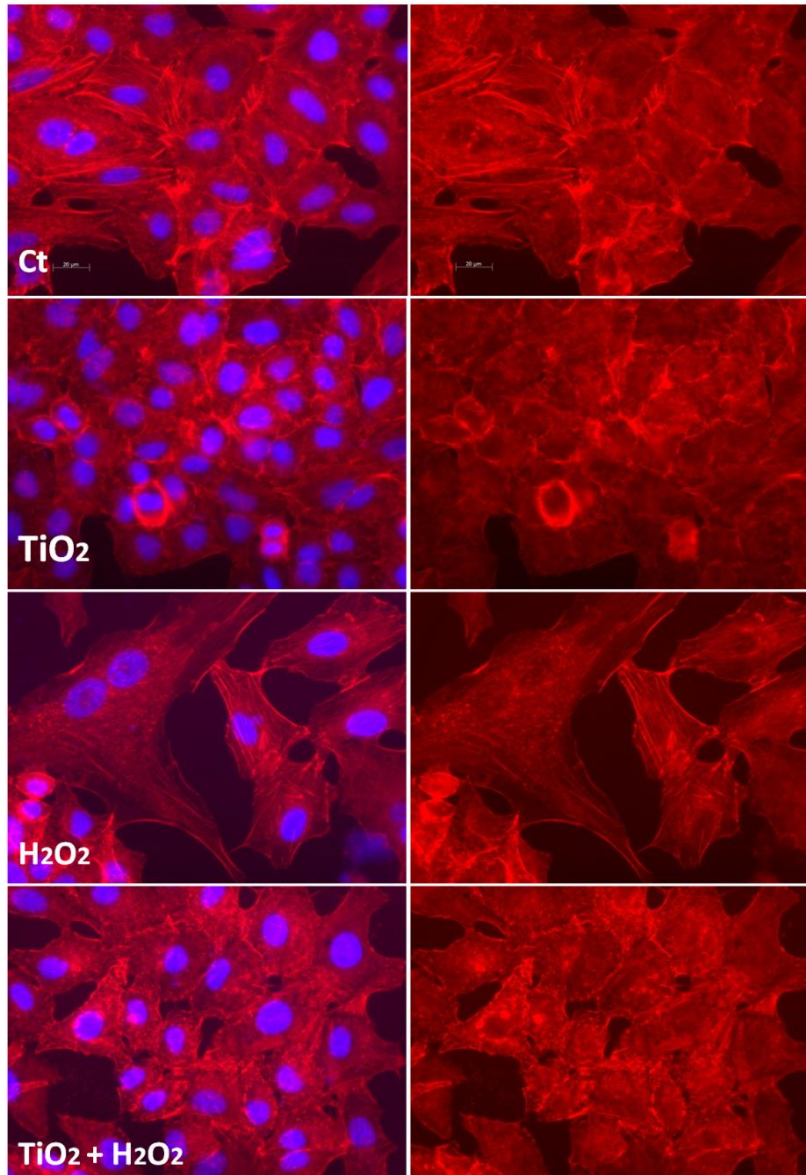


Figura 19. Células epiteliales de pulmón teñidas con faloidina rodaminada y hoescht. Las células fueron previamente tratadas con NPs-TiO₂ (5 µg/cm²) durante 24 h, H₂O₂ (0.5 mM) durante 18 h y la combinación de los tratamientos. Las mitocondrias que fueron tratadas con TiO₂ (5 µg/cm²) presentaron cambios visibles en los filamentos de actina, después de recibir el tratamiento desaparecieron. Los tratamientos control y con H₂O₂ (0.5 mM) no presentaron cambios visibles en la remodelación de citoesqueleto.

5.0 Discusión

Los nanomateriales (NMs) han permitido avances científicos y tecnológicos importantes y se estima que la producción anual de NPs-TiO₂ entre el año 2006 y 2010 fue de 5,000 toneladas métricas, mientras que del 2010 al 2014 incrementará a 10,000 toneladas métricas. Para el 2025 se producirán 2.5 millones de toneladas métricas de NPs-TiO₂ (Menard, 2011) y esta producción acelerada en los últimos años representa un grave problema de contaminación y en la salud para el humano.

Debido al riesgo que representa la exposición a las NPs-TiO₂ se han estudiado los posibles efectos tóxicos utilizando modelos *in-vivo* e *in-vitro*, los cuales tienen el propósito de explicar cómo las NPs-TiO₂ entran por diferentes vías al organismo (Christensen et al. 2011). Los estudios se han enfocado en estudiar tres vías sumamente importantes de exposición a NPs-TiO₂: la vía oral, a la que está expuesta toda aquella persona que ingiera productos que contengan colorantes artificiales que usen como base las NPs-TiO₂. La vía cutánea es la vía a la que la mayoría de las personas se encuentra expuesta cada vez que se aplican cremas corporales, bloqueadores solares y cosméticos. Los trabajadores de las fábricas de NPs-TiO₂ son quienes se encuentran principalmente vulnerables a intoxicarse con el compuesto por la vía inhalatoria (Jonaitis y Card, 2010).

Debido a que la vía inhalatoria es una de las más importantes y que las personas expuestas por esta vía inhalan una cantidad significativa de NPs-TiO₂, diversos grupos de investigadores se han dado a la tarea de comprender los daños que las NPs-TiO₂ causan en los pulmones una vez que han sido inhaladas.

Dentro de los daños encontrados por las NPs-TiO₂ en los pulmones, se encuentran procesos inflamatorios acompañados de liberación de interleucinas, daño en el epitelio pulmonar y alteraciones morfológicas (Berube et al. 2011). El efecto más alarmante que se ha encontrado por esta vía, es la formación de tumores en pulmones de rata (Christensen et al. 2011). Por otro lado, los efectos

encontrados a nivel celular son el incremento en la citotoxicidad, genotoxicidad (Renwick et al. 2004), daño en DNA (Singh et al. 2007), formación de micronúcleos y daño en la mitocondria que incluye alteraciones en los parámetros respiratorios mitocondriales (CRI y P/O), alteraciones en el potencial de membrana y sobreproducción de ROS (Freyre et al. 2010). Este último efecto resulta de gran importancia porque la mitocondria es el organelo que genera mayor cantidad de ROS dentro de la célula, el daño sobre este organelo puede provocar la muerte celular (Zhao et al. 2009).

Por lo ya dicho sobre las NPs-TiO₂ y sus efectos, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto subtóxico de NPs-TiO₂ frente a un reto oxidante de H₂O₂ sobre la función mitocondrial de pulmón de rata y si provoca daño en la conformación del citoesqueleto de células epiteliales de pulmón.

Uno de los aspectos más importantes para iniciar este estudio, fue el planteamiento de cuál es la concentración de NPs-TiO₂ que llega a las mitocondrias pulmonares por la vía inhalatoria. Se estima que durante una exposición ocupacional de ~40 mg/m³ de NPs-TiO₂, en una jornada laboral de 8h al día durante 11 días, una persona internaliza 38 mg de NPs-TiO₂/kg de pulmón (Hougaard et al. 2010). Si tomamos en cuenta este dato, podemos hacer una estimación de la concentración de NPs-TiO₂ que está en contacto directo con las mitocondrias. Si aplicamos las mismas condiciones al peso real un pulmón que es de 1200g y tomamos en cuenta que 3% del peso del pulmón corresponde a proteína mitocondrial, tenemos que la concentración de NPs-TiO₂ que está en contacto con las mitocondrias es de 1,360 µg de NPs-TiO₂ /Kg de pulmón. Para realizar una mejor estimación debemos tomar en cuenta que cuando las NPs-TiO₂ entran a la célula, son englobadas dentro de fagosomas que impiden el contacto directo con los demás organelos celulares. Estos fagosomas frecuentemente se rompen liberando a la NPs-TiO₂ en el citoplasma (Singh et al. 2007). Al agregar la concentración de 5 µg de NPs-TiO₂ por mg de proteína mitocondrial, asume que de la cantidad total de NPs-TiO₂ que entra a los pulmones sólo el 0.1 % está en contacto directo con las mitocondrias. Como ya se demostró en el presente trabajo

está concentración (5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de NPs-TiO₂) no afectaron la viabilidad a las mitocondrias de pulmones sanos. Sin embargo mitocondrias de pulmones inflamados, sometidas a un ambiente oxidante por la presencia de H₂O₂, podrían ser más vulnerables a los efectos de sub-tóxicos de las NPs-TiO₂.

Por lo anterior la hipótesis del presente trabajo fue que la pre-exposición a NPs-TiO₂ en concentraciones subtóxicas predispone a daño mitocondrial y las alteraciones en citoesqueleto inducido por un agente oxidante, en mitocondrias aisladas de pulmón de rata y en células de epiteliales de pulmón, respectivamente.

Los resultados de la tesis muestran que las mitocondrias y células epiteliales de pulmón pre-incubadas con una concentración subtóxica de NPs-TiO₂ presentaron predisposición a adquirir daño cuando un ambiente oxidante con H₂O₂ está presente. Normalmente la concentración de H₂O₂ que se produce en los pulmones se encuentra en concentraciones micromolares (μM), pero en personas que fuman y en personas con enfermedades crónicas la producción el H₂O₂ se incrementa hasta concentraciones milimolares (mM) (Dekhuijzen et al. 1996). Por lo anterior personas con enfermedades pulmonares inflamatorias como asma y efisema pulmonar (Boots 2003), aparentemente son más vulnerables al daño que ocasionan las NPs-TiO₂ cuando son inhaladas aún en bajas concentraciones.

Para determinar el efecto de las NPs-TiO₂ sobre la función de las mitocondrias, se midieron parámetros característicos que permiten determinar el funcionamiento del organelo. Dentro los parámetros que permitieron el análisis de la función mitocondrial fueron CRI, P/O, repolarización de la membrana mitocondrial, fase lag, producción de ATP y potencial de membrana. Es importante mencionar que la mayoría de los parámetros medidos presentaron alteraciones bajo las condiciones de NPs-TiO₂ y reto oxidante con H₂O₂.

El CRI de las mitocondrias disminuyó hasta un 70% cuando fueron pre incubadas con NPs-TiO₂ (5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína mitocondrial; Figura 8) y después sometidas al reto oxidante de H₂O₂ 0.5 mM. La disminución del CRI hasta 70 % sólo cuando se le aplicó el H₂O₂, es evidencia de que las NPs-TiO₂ en concentraciones sub-

tóxicas potencian el daño mitocondrial. La disminución del CRI indica que las mitocondrias son menos eficientes consumiendo oxígeno que las mitocondrias normales (Figura 8). Los valores de la P/O disminuyeron hasta 50% (Figura 8) sólo cuando se les aplicó NPs-TiO₂ y posteriormente H₂O₂. La disminución de la P/O determina que la misma cantidad de oxígeno fosforile el doble de ADP normal en condiciones respecto a las mitocondrias tratadas con NPs-TiO₂ después H₂O₂. Los valores de fase lag y repolarización (Figura 10 y 11) de igual forma que el CRI y la P/O disminuyeron drásticamente cuando se combinó el efecto de las NPs-TiO₂ y H₂O₂. La disminución de la fase lag hasta 50% y de la repolarización de 50% indica que estas mitocondrias se tardan el doble de tiempo en consumir el ADP y fosforilarlo que las mitocondrias sin tratamiento. Los resultados anteriores concuerdan con los valores de la producción de ATP, con respecto a las mitocondrias control, las mitocondrias tratadas con la combinación del tratamiento produjeron sólo 50% del ATP en comparación con las controles (Figura 9)

La disminución del potencial de membrana fue de 66% (Figura 12 y 13) con respecto al control. La medición del potencial de membrana es una medición indirecta de la actividad de los complejos mitocondriales de la cadena de transporte de electrones (CTE) (Murphy et al. 2009). Si los complejos son dañados es muy probable que el potencial de membrana se modifique. También daños en el complejo V afectan el potencial de membrana, si la fracción F₀ de este complejo deja de girar entonces los protones que fluyen por los canales I y II de la subunidad F₁ dejarán de fluir, teniendo como consecuencia la disminución del potencial de membrana.

Los datos anteriores toman enorme importancia porque las mitocondria de células tumorales presentan altos niveles de hipoxia, disminución del potencial de membrana, producción de altos niveles de ROS y disminución de la síntesis de ATP (Valko et al. 2007; Chen et al. 2008). Esta observación es importante dado que ya se ha evidenciado que las NPs-TiO₂ inducen tumores en pulmones de rata.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la mitocondria regula procesos celulares importantes como la apoptosis, diferenciación y división celular, por esta razón la modificación de su función afecta directamente a la célula en estos procesos. Para tener un mejor panorama de los efectos de las NPs-TiO₂ en concentraciones subtóxicas frente a un reto oxidante, fue necesario utilizar un modelo celular, en donde se midió la viabilidad de las células y se analizó el estado de los núcleos y el estado del citoesqueleto empleando técnicas de microscopía confocal.

Los resultados de la tinción de Hoescht, muestran que tanto los núcleos del control como a los que se les administraron las NPs-TiO₂, no están en estado apoptótico (Figura 18). La aplicación de la combinación de los tratamientos presentó mayor cantidad núcleos en fase mitótica sugiere la siguiente interrogante: ¿las células tratadas con las NPs-TiO₂ están promoviendo la duplicación celular? esta pregunta tiene relación con la evidencia de que las mitocondrias cuando son tratadas con una concentración subtóxica de NPs-TiO₂ y posteriormente son sometidas a un reto oxidante, adquieren características de mitocondrias tumorales, por lo que se puede pensar que el tratamiento combinado induce la proliferación, que es característica de células tumorales (Ralf et al. 2010)

La tinción con faloidina rodamina nos permitió determinar el estado del citoesqueleto celular (Figura 19). El resultado de esta prueba muestra que el citoesqueleto de actina en células epiteliales tratadas con las NPs-TiO₂ presentó mayor desorganización. La modificación del citoesqueleto de actina se puede dar por interferencia de la polimerización de los monómeros de actina o como ya se mencionó por la activación de la transformación celular.

Una vez que las NPs-TiO₂ entran a la célula y se encuentran en el citoplasma, entonces pueden interactuar con las fibras de actina. Se ha reportado las NPs-TiO₂ pueden interactuar con las proteínas (Nel et al. 2009) por lo que podrían interaccionar con los monómeros de actina impidiendo que se formen los polímeros de actina. También se ha descrito que una de las características

particulares de las células cuando se transforman, es la modificación estructural del citoesqueleto (Ralph et al. 2010).

Con las observaciones hechas sobre las mitocondrias, el estado de los núcleos y la disrupción del citoesqueleto, el presente trabajo propone que las NPs-TiO₂ inducen la activación de la siguiente ruta, ya que se sabe que es regulada por la mitocondria.

Las rutas de las MAPK son activadas por el ROS que producen los complejos I y III. La ruta de las MAPK por sus siglas en inglés “mitogen-activated protein kinase”, tiene como objetivo la activación de proteínas relacionadas directamente con el control proliferativo celular, ciclo celular, crecimiento, diferenciación y apoptosis en células de mamífero. Es razonable pensar que un compuesto como las NPs-TiO₂ que muestra clara inducción de formación de tumores, puede estar al menos en parte, modulada a través de la ruta ERK1/2 (Huang et al. 2007).

Se ha determinado que las mitocondrias tienen un papel fundamental en el metabolismo de transformación celular carcinogénica. Para que esta transformación suceda es necesario que dentro de la célula se modifique el metabolismo normal. En la actualidad ya es un hecho que dentro de algunas líneas celulares cancerosas se detiene la CTE, por esa razón se incrementa la glucólisis y de esta forma la célula genera ATP. Además de la hipoglucemia, se genera un ambiente hipóxico por la falta de oxígeno a causa de la inhibición de la CTE. El incremento a las ROS mitocondria también es la consecuencia de daño en enzimas de la cadena respiratoria. El estrés oxidativo generado a causa de la mitocondria, oxida tanto al DNA mitocondrial como al DNA nuclear. El estrés oxidante también provoca que las enzimas reparadoras del DNA se inhiban, lo que incrementa la probabilidad de que se activen los genes que causan cáncer (Ralph et al. 2010). Es muy probable que la ruta de transformación celular esté relacionada con inducción de tumores por las NPs-TiO₂.

Conclusión

La exposición a una concentración subtóxica de NPs-TiO₂ indujo predisposición a daño en la función de mitocondrias de pulmón de rata y cambios conformacionales en el citoesqueleto de células epiteliales de pulmón cuando se les aplicó un reto oxidante de H₂O₂.

Referencias

- Bar-Ilan O, Louis KM, Yang SP, Pedersen JA, Hamers RJ, Peterson RE, Heideman W. Titanium dioxide nanoparticles produce phototoxicity in the developing zebrafish. (2011). *Nanotoxicology*. En prensa.
- Berube D, Cummings C, Cacciatore M, Scheufele D, Kalin J. Characteristics and classification of nanoparticles: Expert Delphi survey. (2011). *Nanotoxicology*. 5, 236-243.
- Boots AW, Haenen GR, Bast A. Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. (2003). *Eur Respir J*. 46, 14-27.
- Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. (2000). *Int Microb* 3, 3-8.
- Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL y Lesnefsky EJ. Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. (2008). *Cell Physiol*. 294, 460-466.
- Christensen FM, Johnston HJ, Stone V, Aitken RJ, Hankin S, Peters S, Aschberger K. Nano-TiO₂-feasibility and challenges for human health risk assessment based on open literature. (2011). *Nanotoxicology*. 5, 110-124.
- Day RM, Suzuki YJ. Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione. (2006). *Dose-Response*. 3, 425-442.
- Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, Aarts LP, Wielders PL, van Herwaarden CL, Bast A. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. (1996). *Care Med*. 154, 813-816.
- Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. (2007). *Nature*. 8-870-879.
- DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial Disorders in the Nervous System. (2010). *Annual review*. 31, 91-123.
- Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. (2004). *Science*. 304, 253-257.

- Foster CR, Robson JL, Simon WJ, Twigg J, Cruikshank D, Wilson RG, Hutchison CJ. The role of Lamin A in cytoskeleton organization in colorectal cancer cells: A proteomic investigation. *Nucleus*. (2011). Epub, en prensa.
- Fernandez Ibáñez Pilar. Propiedades coloidales de partículas de TiO₂: aplicado al tratamiento fotocatalítico solar de aguas. (2005). 337. Presentado en la Universidad de Almeida para la obtención del grado de doctor en ciencias físicas.
- Falck GC, Lindberg HK, Suhonen S, Vippola M, Vanhala E, Catalán J, Savolainen K, Norppa H. Genotoxic effects of nanosized and fine TiO₂. (2009). *Hum Exp Toxicol*. 28, 339-352.
- Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. (2005). *Environ Health Perspect*. 113,1555–1560.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. (1973). *J. Natl. Cancer Inst*. 51, 1417-1423.
- Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. (2005). *Toxicology*. 21, 366–73.
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. (1996). *J. Biol. Chem*. 8, 4138-4142.
- Hilger I, Hiergeist R, Hergt R, Winnefeld K, Schubert H, Kaiser WA. Thermal ablation of tumors using magnetic nanoparticles An in vivo feasibility study. (2002). *Investig. Radiol*. 37, 580-586.
- Huang S, Chueh PJ, Lin YW, Shih TS, Chuang SM. Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO₂ long-term exposure. (2009). *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 241, 182-194.

- Hussain S, Boland S, Baeza-Squiban A, Hamel R, Thomassen LC, Martens JA, Billon-Galland MA, Fleury-Feith J, Moisan F, Pairon JC, Marano F. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. (2009). *Toxicology*. 260, 142-149.
- Hussain S, Thomassen LC, Ferecatu I, Borot MC, Andreau K, Martens JA, Fleury J, Baeza-Squiban A, Marano F, Boland S. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. (2010). *Part. Fibre. Toxicol.* 16, 7-10.
- Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. (2005). *Toxicol In Vitro*. 19, 975-983.
- Jonaitis TS, Card JW, Magnuson B Concerns regarding nano-sized titanium dioxide dermal penetration and toxicity study. (2010). *Toxicol. Lett.* 192, 268-269.
- Jeng HA, Swanson J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. J. (2006). *Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 41, 2699-2711.
- Kang HS, Nelson ML, Mackereth CD, Scha"rpf M, Graves BJ, and McIntosh, L.P. Identification and structural characterization of a CBP/p300-binding domain from the ETS family transcription factor GABP alpha. (2008). *J. Mol. Biol.* 377, 636-646.
- Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. (2004). *Toxicol.* 44, 239-267.
- Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, Kim BG, Park SJ, Kim HW, Lee KH, Park SB, Lee JK, Cho MH. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. (2006). *Toxicol.* 89, 338-347.
- Lecoanet H, Wiesner M. 2004. Velocity effects on fullerene and oxide nanoparticle deposition in porous media. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4377-4382.

- Li N, Duan Y, Hong M, Zheng L, Fei M, Zhao X, Wang J, Cui Y, Liu H, Cai J, Gong S, Wang H, Hong F. Spleen injury and apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. (2010). *Toxicol. Lett.* 195, 161-168.
- Lin S, Keskar D, Wu Y, Wang X, Mount AS, Klaine SJ, More JM, Rao AM, Ke PC. Detection of phospholipid-carbon nanotube translocation using fluorescence energy transfer. (2007). *Applied. Physics. Letters* 89, 118-143.
- Liu SS. Mitochondrial Q cycle-derived superoxide and chemiosmotic bioenergetics. (2010). *NY Acads.* 77, 23-89.
- Marano F, Hussain S, Rodrigues-Lima F, Baeza-Squiban A, Boland S. Nanoparticles molecular targets and cell signalling. (2010). *Arch. Toxic.* 85, 733-741.
- Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in Neuroplasticity and Neurological Disorders. (2008). *Neuron.* 60, 748-766.
- Menard A, Drobne D, Jemec A. Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. (2010). *Environ. Pollut.* 159, 677-684.
- Mendoza-Anaya D, Salas P, Angeles-Chavez C, Perez-Hernández R, Castaño VM. (2003) Caracterización microestructural y morfología de TiO₂ para aplicaciones termoluminiscentes. *Revista Mexicana de Física.* 50, 12-16.
- Mueller NC, Nowack B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. (2008). *Environ. SciTechnol.* 42, 4447-4453.
- Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. (2009). *Biochem. J.* 417, 1-13.
- Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. (2009). *Nature Materials.* 8, 543-557.
- Ninomiya K, Ogino C, Oshima S, Sonoke S, Kuroda SI, Shimizu N. Targeted sonodynamic therapy using protein-modified TiO₂ nanoparticles. (2011). *Ultrason Sonochem.* En prensa.

- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Concepts of nanoparticle dose metric and response metric. (2007). *Environ. Health Perspect.* 115, A-290.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. (2004). *Inhal. Toxicol.* 16, 437-445.
- Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Neuzil J, Saavedra E, Moreno-Sánchez R. The causes of cancer revisited: “Mitochondrial malignancy” and ROS-induced oncogenic transformation - Why mitochondria are targets for cancer therapy. (2010). *Mol Aspects Med.* 31, 145-170.
- Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. (2004). *Occupat Environ Med.* 61, 442-447.
- Roberts AP, Mount AS, Seda B, Souther J, Qiao R, Lin S, Ke PC, Rao AM, Klaine SJ. In vivo biomodification of lipidcoated carbon nanotubes by *Daphnia magna*. (2007). *Environ. Sci. Technol.* 41, 3025-3029.
- Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. (2006). *Toxicol.* 92,174-185.
- Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. 2007. The appropriateness of the risk assessment methodology in accordance with the Technical Guidance Documents for new and existing substances for assessing the risks of nanomaterials. (2007). European Commission, Brussels, Belgium.
- Senior AE, Nadanaciva S, Weber J. The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase. (2002). *Biochim. Biophys. Acta* 1553, 188-211.
- Singh S, Shi T, Duffin R, Albrecht C, van Berlo D, Höhr D, Fubini B, Martra G, Fenoglio I, Borm PJ, Schins RP. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and

- ultrafine TiO₂: Role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. (2007). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222,141-151.
- Smit-de Vries MP, van der Toorn M, Bischoff R, Kauffman HF. Resistance of quiescent and proliferating airway epithelial cells to H₂O₂ challenge. (2007). *European Respiratory Journal.* 29, 633-642.
 - Shukla RK, Sharma V, Pandey AK, Singh S, Sultana S, Dhawan A. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticle in human epidermal cells. (2010). *Toxicology in vitro.* 25, 231-241.
 - Stryer L, Tymoczko JL, Berg JM. *Bioquímica*. 6ta edición. ER. Barcelona. 2007. Pp. 502-520.
 - Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a Pharmacological Target. (2002). *Pharmacol rev.* 54,101-127.
 - Toth PP, Sumerix KJ, Ferguson-Miller S, Suelter CH. Respiratory control and ADP:O coupling ratios of isolated chick heart mitochondria. (1990). *Arch. Biochem. Biophys.* 276, 199-211.
 - Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability In vivo in Mice. (2009). *Journal of Toxicology and Cancer Res.* 15., 8784-8789.
 - Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. (2006). *Chem. Biol. Interact.* 160, 1-40.
 - Vamanu CI, Cimpan MR, Hol PJ, Sornes S, Lie SA, Gjerdet NR. Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: studies on a human monoblastoid cell line. (2008). *Toxicol. In Vitro.* 22, 1689-1696.
 - Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev.* (2009). *Nat Rev Cancer.* 9, 537-549.
 - Wakefield G, Green M, Lipscomb S. y Flutter B. Modified titania nanomaterials for sunscreen applications Reducing free radical generation and DNA damage. (2004). *Mater. Sci. Technol.* 20, 985-988.

- Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. (2005). *Annu. Rev. Genet.* 39, 359-407.
- Wang JJ, Sanderson BJ, Wang H. Cytotoxicity and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. (2007). *Mutat. Res.* 628, 99-106.
- Wang H, and Morais R. Up-regulation of nuclear genes in response to inhibition of mitochondrial DNA expression in chicken cells. (1997). *Biochim. Biophys. Acta*, 1352, 325-334.
- Weber J, Senior AE. ATP synthesis driven by proton transport in F₁F₀-ATP synthase, (2002). *FEBS Lett.* 545, 61-70.
- Weber J. ATP synthase: Subunit-subunit interactions in the stator stalk. (2006). *Biochim. Biophys. Acta.* 1757, 1162-1170.
- White CW, Repine JE. Pulmonary antioxidant defense mechanisms. (1985). *Exp. Lung Res.* 8, 81-96.
- Zhao J, Bowman L, Zhang X, Vallyathan V, Young SH, Castranova V, Ding M. Nanoparticles Induce JB6 Cell Apoptosis through activation of the caspase-8/Bid and mitochondrial pathways. (2009). *J. Toxicol. Environ. Health A.* 72, 1141-1149.

Abreviaturas

ADP: Adenil difosfato

ATP: Adenil trifosfato

CCCP: carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona

CRI: Cntrol respiratorio

CTE: Cadena de transporte de elctrones

EDTA:

ERK:

IARC:

IL: Interleusinas

MAPK:

MTT:

NMs: Nanomateriales

NPs: Nanopartículas

NPs-TiO₂: Nanopartículas de dióxido de titanio

P/O: Relación consumo de oxígeno síntesis de ADTP

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SOD: Súper óxido dismutasa