



**Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**Efecto del Dióxido de Titanio ( $\text{TiO}_2$ ) y el Peróxido de Hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en la función de los complejos respiratorios mitocondriales.**

Que para obtener el título de  
**Bióloga**

PRESENTA

**Irlanda Joanna Espinosa García**

Asesora

**Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid**



**Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2013.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 del Dióxido de Titanio (TiO<sub>2</sub>) y el Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en la función de los complejos respiratorios mitocondriales

i	Abreviaturas .....	10
ii	Dedicatorias.....	12
iii	Agradecimientos .....	13
iv	Resumen.....	14
<b>1.</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1</b>	<b>Nanopartículas .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2</b>	<b>Dióxido de Titanio (TiO<sub>2</sub>) .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3</b>	<b>La Mitocondria.....</b>	<b>18</b>
1.3.1	Membrana Externa .....	19
1.3.2	Espacio Intermembranal.....	20
1.3.3	Membrana Interna.....	20
1.3.4	Matriz mitocondrial .....	21
<b>1.4</b>	<b>La cadena de transporte de electrones.....</b>	<b>22</b>
1.4.1	Complejo I .....	23
1.4.2	Complejo II .....	24
1.4.3	Coenzima Q.....	24
1.4.4	Complejo III .....	25
1.4.5	Citocromo c .....	25
1.4.6	Complejo IV.....	25
1.4.6	Complejo V .....	26
1.4.7	Organización de la cadena respiratoria .....	27
1.4.8	Deficiencias en la cadena de transporte de electrones.....	29
<b>1.5</b>	<b>Especies Reactivas de Oxígeno.....</b>	<b>29</b>
<b>2.</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>30</b>
<b>3.</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>31</b>
<b>4.</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiales para los tratamientos.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Extracción de mitocondrias.....</b>	<b>32</b>
<b>4.3</b>	<b>Estudio de las mitocondrias .....</b>	<b>32</b>

4.4	<b>Ensayo 1, Actividad de los Complejos III y IV</b>	34
4.5	<b>Ensayo 2, Actividad de los Complejos I y II</b>	35
4.7	<b>Solubilización de mitocondrias para los geles nativos:</b>	36
4.8	<b>Geles hrCNE</b>	37
4.9	<b>Tinción con Coomassie</b>	37
4.10	<b>Ensayos de Actividad en geles nativos, complejo I y II</b>	38
4.11	<b>Ensayo de Actividad en geles nativos, complejo III y IV</b>	38
4.12	<b>Ensayo de Actividad en geles nativos, ATPasa</b>	38
4.13	<b>Geles de 2D (SDS-PAGE)</b>	38
4.14	<b>Tinción con Plata</b>	39
5.	<b>Resultados</b>	39
5.1	<b>Obtención de las mitocondrias</b>	39
5.2	<b>Estudio de las mitocondrias</b>	40
5.3	<b>Actividad de los cuatro complejos respiratorios</b>	42
5.3.1	Actividad de los complejos I y II	42
5.3.2	Actividad de los complejos III y IV	44
5.4	<b>Actividad de los cuatro complejos respiratorios en presencia de SOD y Catalasa</b>	45
5.4.1	Actividad de los complejos I y II en presencia de SOD y Catalasa	45
5.4.2	Actividad de los complejos III y IV en presencia de SOD y Catalasa	47
5.5	<b>Actividades remanentes de los complejos respiratorios</b>	48
5.6	<b>Geles hrCNE</b>	49
5.7	<b>Actividad en gel de los complejos I y II</b>	53
5.8	<b>Actividad en gel complejos III y IV</b>	56
5.9	<b>Actividad en gel ATPsintasa</b>	59
5.10	<b>Tinción con Tetrametil Bencidina</b>	59
5.11	<b>Geles 2D</b>	61
5.11.3	Mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con $TiO_2$	67
6.	<b>Discusión</b>	69
7.	<b>Conclusión</b>	73
8.	<b>Literatura Citada</b>	74

## Índice de Figuras

<i>Figura 1. Un cubo de 4cm tiene un volumen igual a 64 cubos de 1cm, sin embargo, presenta una superficie de contacto menor. Así según el tamaño, un material de masa igual, puede presentar una mayor superficie de contacto. Tomado de Instituto Riojano de Salud Laboral (2011).</i>	15
<i>Figura 2. Lugares de depósito de partículas inhaladas en las regiones nasofaríngea (○), traqueo bronquial (◇) y alveolar (□) del aparato respiratorio de humano durante la respiración nasal. Modificado de Oberdorster et al. (2005).</i>	16
<i>Figura 3. Nanopartículas de la forma anatasa de TiO<sub>2</sub> (15nm). Tomado de Comisión Europea (2012).</i>	17
<i>Figura 4. Fotografía de una mitocondria de célula pancreática obtenida en microscopio electrónico (x190,000) en la que se señalan las cuatro partes en que se divide la mitocondria: membrana externa, espacio intermembranal, membrana interna (la cual se pliega formando crestas mitocondriales) y la matriz mitocondrial. Modificado de Scheffler (2008).</i>	19
<i>Figura 5. Esquema de una mitocondria señalando las proteínas de que se compone en sus membranas interna, externa, espacio intermembranal y matriz mitocondrial. Calcio (Ca<sup>++</sup>), Oxígeno (O<sub>2</sub>), isocitrato, cetoglutarato, succinato, fumarato, malato, oxalacetato (OAA), nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), acetil coenzima A (Acetil CoA), citrato, aconitato, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>); piruvato deshidrogenasa (PDH); complejos I, II, III, IV, V y subunidad V<sub>F0</sub>; coenzima Q (CoQ); translocador del nucleótido adenina (ANT); translocador de la membrana interna (TIM), endonucleasa G; factor inductor de apoptosis (AIF); translocador de la membrana externa (TOM); canal dependiente de voltaje (VDAC); adenosin difosfato (ADP); fosfato inorgánico (Pi); adenosin trifosfato (ATP); Modificado de Wallace (1999)</i>	20
<i>Figura 7. Dirección del flujo de electrones y relaciones energéticas en la cadena espiratoria. Existen tres etapas cuya en las que se producen decrementos de energía libre relativamente grandes al circular los electrones, superiores a los 31kJ/mol, que es el valor para la hidrólisis del ATP: FMN -&gt; CoQ, cit b -&gt; cit c<sub>1</sub> y cit a -&gt; O<sub>2</sub>. Modificado de Mathews et al., (2002).</i>	22
<i>Figura 7. Esquema de la cadena de transporte de electrones y de la translocación de protones, que se lleva a cabo en la membrana interna mitocondrial, para la síntesis de ATP durante la respiración celular. Se muestran los cuatro complejos respiratorios, la CoQ, el citocromo c y la ATPasa (Complejo V). Modificado de Rea (2012).</i>	23
<i>Figura 9. Esquema representativo del ciclo Q, ilustra el camino de los electrones desde el ubiquinol al citocromo c pasando por el complejo bc<sub>1</sub> mostrando también los protones translocados a través de la membrana (imagen modificada de Trumpower (1990).</i>	25
<i>Figura 10. a) Esquema de la ATPsintasa y sus subunidades durante la síntesis de ATP. b) Tabla de las subunidades pertenecientes a la porción F1 (porción membranal) y F0 (porción soluble) de la ATPsintasa. Modificada de Dabbeni-Sala (2011).</i>	27
<i>Figura 11. Modelos de la organización de los complejos respiratorios. a) Modelo del estado fluido, b) Modelo del estado sólido con los supercomplejos, c) Modelo integrado. M matriz; IM membrana interna; IMS espacio intermembranal. Tomado de Dudkina et al. (2008)</i>	28
<i>Figura 12. Especies reactivas de oxígeno (ROS); superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.</i>	30
<i>Figura 13. Diagrama de la metodología</i>	31
<i>Figura 14. Trazo obtenido al medir la actividad del complejo III utilizando 0.1mg de proteína mitocondrial, 40μM de cit c, 50μM DBH<sub>2</sub>. Se muestra el orden en que deben agregarse los distintos sustratos e inhibidores a lo largo del tiempo para obtener un cambio en la absorbencia del citocromo c.</i>	34
<i>Figura 15. Trazo obtenido al medir la actividad de los complejos III y IV. Se muestra el orden en que deben agregarse los distintos sustratos e inhibidores a lo largo del tiempo para obtener un cambio en la absorbencia del citocromo c.</i>	35
<i>Figura 16. Trazo obtenido al medir la actividad de los complejos I y II. Se muestra el orden en que deben agregarse los distintos sustratos e inhibidores a lo largo del tiempo para obtener un cambio en la absorbencia del DCPIP.</i>	36
<i>Figura 17. Espectro diferencial de absorción (reducido con ditionita – oxidado) de mitocondrias aisladas de (a) pulmón y (b) corazón por el método de Chappell y Perry. Se muestra la ubicación de los picos α de absorción de los citocromos a, b y c. Se</i>	

señala con la línea la distorsión en el espectro, creada por la presencia de oxihemoglobina en las mitocondrias extraídas de pulmón de rata.	40
Figura 18. Espectro diferencial de absorción (reducido con ditionita – oxidado) de las mitocondrias aisladas de pulmón por el método de Chappell y Perry con el posterior lavado con medio tris-KCl (Matsubara and Tochino 1971). Se muestra la ubicación de los picos $\alpha$ de absorción de los citocromos a, b, y c. Se señala con la línea punteada, dónde se encontraba la distorsión en el espectro de absorción creada por la presencia de oxihemoglobina.	41
Figura 19. a) Ensayo de Actividad del complejo III con diferentes cantidades de mitocondrias extraídas de pulmón de rata, siguiendo la reducción del citocromo c de caballo a 550 – 540nm ( $\blacklozenge$ Control de reducción química; $\blacksquare$ 0.1mg proteína mitocondrial; $\blacktriangleright$ 0.2mg proteína mitocondrial; $\bullet$ 0.3 mg proteína mitocondrial), b) Tabla con los valores de actividad para 0.1, 0.2 y 0.3 mg de proteína por ensayo expresados en nmoles cit c reducido $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ .	42
Figura 20. Actividad de NADH deshidrogenasa (complejo I) de mitocondrias extraídas de pulmón de rata luego de sus distintos tratamientos con 0.2 $\mu\text{g}$ $\text{TiO}_2/\text{mg}$ de proteína durante 30min (CV = 9%), 12 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ durante 60min (CV = 38%) y 0.2 $\mu\text{g}$ $\text{TiO}_2/\text{mg}$ de proteína durante 30min seguido de a 12 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ durante 60 min (CV = 12%). Datos normalizados con respecto a la actividad del control (n=3).	43
Figura 21. Actividad de Succinato deshidrogenasa (complejo II) de mitocondrias extraídas de pulmón de rata luego de sus distintos tratamientos con 0.2 $\mu\text{g}$ $\text{TiO}_2/\text{mg}$ de proteína durante 30min (CV = 25%), 12 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ durante 60min (CV = 60%) y 0.2 $\mu\text{g}$ $\text{TiO}_2/\text{mg}$ de proteína durante 30min seguido de a 12 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ durante 60 min (CV = 75%). Datos normalizados con respecto a la actividad del control (n=3).	43
Figura 22. Actividad de ubiquinol citocromo c oxidoreductasa (complejo III) de mitocondrias extraídas de pulmón de rata luego de sus distintos tratamientos con 0.2 $\mu\text{g}$ $\text{TiO}_2/\text{mg}$ de proteína durante 30min (CV = 15%), 12 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ durante 60min (CV = 22%) y 0.2 $\mu\text{g}$ $\text{TiO}_2/\text{mg}$ de proteína durante 30min seguido de a 12 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ durante 60 min (CV = 11%). Datos normalizados con respecto a la actividad del control (n=3).	44
Figura 23. Actividad de citocromo c oxidasa (complejo IV) de mitocondrias extraídas de pulmón de rata luego de sus distintos tratamientos con 0.2 $\mu\text{g}$ $\text{TiO}_2/\text{mg}$ de proteína durante 30min (CV = 86%), 12 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ durante 60min (CV = 77%) y 0.2 $\mu\text{g}$ $\text{TiO}_2/\text{mg}$ de proteína durante 30min seguido de a 12 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ durante 60 min (CV = 73%). Datos normalizados con respecto a la actividad del control (n=3).	45
Figura 24. Actividad de NADH deshidrogenasa (complejo I) de mitocondrias extraídas de pulmón de rata en presencia de SOD y Catalasa luego de sus distintos tratamientos con 0.2 $\mu\text{g}$ $\text{TiO}_2/\text{mg}$ de proteína durante 30min (CV = 11%), 12 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ durante 60min (CV = 15%) y 0.2 $\mu\text{g}$ $\text{TiO}_2/\text{mg}$ de proteína durante 30min seguido de a 12 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ durante 60 min (CV = 12%). Datos normalizados con respecto a la actividad del control (n=3).	46
Figura 25. Actividad de Succinato deshidrogenasa (complejo II) de mitocondrias extraídas de pulmón de rata en presencia de SOD y Catalasa luego de sus distintos tratamientos con 0.2 $\mu\text{g}$ $\text{TiO}_2/\text{mg}$ de proteína durante 30min (CV = 27%), 12 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ durante 60min (CV = 19%) y 0.2 $\mu\text{g}$ $\text{TiO}_2/\text{mg}$ de proteína durante 30min seguido de a 12 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ durante 60 min (CV = 24%). Datos normalizados con respecto a la actividad del control (n=3).	46
Figura 26. Actividad de ubiquinol citocromo c oxidoreductasa (complejo III) de mitocondrias extraídas de pulmón de rata en presencia de SOD y Catalasa luego de sus distintos tratamientos con 0.2 $\mu\text{g}$ $\text{TiO}_2/\text{mg}$ de proteína durante 30min (CV = 14%), 12 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ durante 60min (CV = 16%) y 0.2 $\mu\text{g}$ $\text{TiO}_2/\text{mg}$ de proteína durante 30min seguido de a 12 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ durante 60 min (CV = 9%). Datos normalizados con respecto a la actividad del control (n=3).	47
Figura 27. Actividad de citocromo c oxidasa (complejo IV) de mitocondrias extraídas de pulmón de rata en presencia de SOD y Catalasa luego de sus distintos tratamientos con 0.2 $\mu\text{g}$ $\text{TiO}_2/\text{mg}$ de proteína durante 30min (CV = 25%), 12 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ durante 60min (CV = 24%) y 0.2 $\mu\text{g}$ $\text{TiO}_2/\text{mg}$ de proteína durante 30min seguido de a 12 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ durante 60 min (CV = 25%). Datos normalizados con respecto a la actividad del control (n=3).	48
Figura 28. Porcentaje de actividad remanente de los cuatro complejos respiratorios (n=3, coeficientes de variación de 85% CI control, 88% CI $\text{TiO}_2$ , 78% CI $\text{H}_2\text{O}_2$ , 87% CI $\text{TiO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ ; 51% CII control, 83% CII $\text{TiO}_2$ , 58% CII $\text{H}_2\text{O}_2$ , 44% CII $\text{TiO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ ; 53% CIII control, 54% CIII $\text{TiO}_2$ , 13% CIII $\text{H}_2\text{O}_2$ y 42% CIII $\text{TiO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ ).	48

Figura 29. Porcentaje de actividad remanente en presencia de inhibidores específicos de los cuatro complejos respiratorios y en presencia de SOD y Catalasa durante el ensayo. (n=3, coeficientes de variación de 85% CI control, 86% CI  $\text{TiO}_2$ , 81% CI  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 83% CI  $\text{TiO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ ; 51% CII control, 60% CII  $\text{TiO}_2$ , 40% CII  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 8% CII  $\text{TiO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ ; 103% CIII control, 140% CIII  $\text{TiO}_2$ , 152% CIII  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 136% CIII  $\text{TiO}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ ). \_\_\_\_\_ 49

Figura 30. Gel hrCNE con un gradiente de poliacrilamida del 4 al 13%. Mitocondrias de corazón de rata (MC) solubilizadas con 2.5 mg DDM/mg proteína. Tinción con Coomassie y su respectivo perfil densitométrico (Subíndice 1) bandas que por la cantidad de proteína pueden no ser identificables en todos los carriles. Carril A: 1500 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de corazón de rata; Carril B: 1000 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de corazón de rata; Carril C: 800 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de corazón de rata; Carril D: 400 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de corazón de rata; Carril E: 200 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de corazón de rata; Carril F: 100 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de corazón de rata. \_\_\_\_\_ 50

Figura 31. Gel hrCNE con un gradiente de poliacrilamida del 4 al 13%. Mitocondrias de corazón (MC) y de pulmón (MP) de rata solubilizadas a 2.5 mg DDM/mg proteína. Tinción con Coomassie y su respectivo perfil densitométrico (Subíndice 1). Carril A 100 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias de corazón; Carril B: 800 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón; Carril C: 400 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón; Carril D: 200 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón; Carril E: 100 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón. \_\_\_\_\_ 51

Figura 32. Gel hrCNE con un gradiente del 4 al 13% de poliacrilamida. Mitocondrias de corazón (MC) y mitocondrias de pulmón (MP) de rata solubilizadas con 2.5 mg DDM/mg proteína. Perfil densitométrico (Subíndice 1). Carril A: 100 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de corazón de rata, tinción con Coomassie; Carril B: 400 $\mu\text{g}$  de proteína de Mitocondrias de pulmón, con tinción de actividad histoquímica del complejo I; Carril C: 400 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón de rata, con tinción de actividad histoquímica para el complejo III; Carril D: 400 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón de rata con tinción de actividad histoquímica para el complejo IV; Carril E: 400 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón de rata, con tinción de actividad histoquímica del complejo V; Carril F: 400 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón de rata, tinción con Coomassie. \_\_\_\_\_ 51

Figura 33. Gel hrCNE con un gradiente del 4 al 13% de poliacrilamida. Mitocondrias de corazón (MC) y mitocondrias de pulmón (MP) de rata solubilizadas con 2.5 mg DDM/mg proteína. Tinción con Coomassie y su respectivo perfil densitométrico (Subíndice 1). Carril A: 100 $\mu\text{g}$  de proteína de Mitocondrias de corazón; Carriles B, C y D: 400 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón. Carril B: sin tratamiento (\*\* bandas identificadas en los geles de mitocondrias de pulmón y pueden no pueden ser identificables en los geles de mitocondrias de pulmón con tratamiento de  $\text{TiO}_2$ ); Carril C: mitocondrias de pulmón tratadas con 0.1 $\mu\text{g}$   $\text{TiO}_2$ /mg proteína durante 30 min; Carril E: mitocondrias de pulmón tratadas con 0.5 $\mu\text{g}$   $\text{TiO}_2$ /mg proteína durante 30 min. \_\_\_\_\_ 53

Figura 34. Gel hrCNE con un gradiente del 4 al 13% de poliacrilamida Mitocondrias de corazón (MC) y mitocondrias de pulmón (MP) de rata solubilizadas a 2.5 mg DDM/mg proteína.. Perfil densitométrico (Subíndice 1). Carril A: 100 $\mu\text{g}$  de proteína de Mitocondrias de corazón, tinción de Coomassie; Carril B: 100 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de corazón, tinción de actividad histoquímica del complejo I; Carril C, 400 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de Coomassie; Carril D: 400 $\mu\text{g}$  mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de actividad histoquímica del complejo I; Carril E, 400 $\mu\text{g}$  mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.1 $\mu\text{g}$   $\text{TiO}_2$ /mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo I; Carril F, 400 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.5 $\mu\text{g}$   $\text{TiO}_2$ /mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo I; Carril G, 400 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 1 $\mu\text{g}$   $\text{TiO}_2$ /mg proteína durante 30 min, tinción actividad histoquímica del complejo I. \_\_\_\_\_ 54

Figura 35. Gel hrCNE con un gradiente del 4 al 13% de poliacrilamida Mitocondrias de corazón (MC) y mitocondrias de pulmón (MP) de rata solubilizadas a 2.5 mg DDM/mg proteína. Perfil densitométrico (Subíndice 1). Carril A: 100 $\mu\text{g}$  de proteína de Mitocondrias de corazón, tinción de Coomassie; Carril B: 100 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de corazón, tinción de actividad histoquímica del complejo II; Carril C, 400 $\mu\text{g}$  de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de Coomassie; Carril D: 400 $\mu\text{g}$  mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de actividad histoquímica del complejo II;

Carril E, 400µg mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo II; Carril F, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.5µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo II; Carril G, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción actividad histoquímica del complejo II. \_\_\_\_\_ 55

Figura 36. . Gel hrCNE con un gradiente del 4 al 13% de poliacrilamida Mitocondrias de corazón (MC) y mitocondrias de pulmón (MP) de rata solubilizadas a 2.5 mg DDM/mg proteína. Perfil densitométrico (Subíndice 1). Carril A: 100µg de proteína de Mitocondrias de corazón, tinción de Coomassie; Carril B: 100µg de proteína de mitocondrias extraídas de corazón, tinción de actividad histoquímica del complejo III; Carril C, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de Coomassie; Carril D: 400µg mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de actividad histoquímica del complejo III; Carril E, 400µg mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo III; Carril F, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.5µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo III; Carril G, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción actividad histoquímica del complejo III. \_\_\_\_\_ 57

Figura 37. Gel hrCNE con un gradiente del 4 al 13% de poliacrilamida Mitocondrias de corazón (MC) y mitocondrias de pulmón (MP) de rata solubilizadas a 2.5 mg DDM/mg proteína. Perfil densitométrico (Subíndice 1). Carril A: 100µg de proteína de Mitocondrias de corazón, tinción de Coomassie; Carril B: 100µg de proteína de mitocondrias extraídas de corazón, tinción de actividad histoquímica del complejo IV; Carril C, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de Coomassie; Carril D: 400µg mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de actividad histoquímica del complejo IV; Carril E, 400µg mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo IV; Carril F, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.5µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo IV; Carril G, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción actividad histoquímica del complejo IV. \_\_\_\_\_ 58

Figura 38. . Gel hrCNE de poliacrilamida con un gradiente del 4 al 13%. Mitocondrias de corazón (MC) y mitocondrias de pulmón (MP) de rata solubilizadas a 2.5 mg DDM/mg proteína. Tinción con Coomassie y su respectivo Perfil densitométrico (Subíndice 1). Carril A: 100µg de proteína de Mitocondrias de corazón, tinción de Coomassie; Carril B: 100µg de proteína de mitocondrias extraídas de corazón, tinción de actividad histoquímica del complejo V; Carril C, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de Coomassie; Carril D: 400µg mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de actividad histoquímica del complejo V; Carril E, 400µg mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo V; Carril F, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.5µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo IV; Carril G, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción actividad histoquímica del complejo V. \_\_\_\_\_ 60

Figura 39. Gel hrCNE de poliacrilamida con un gradiente del 4 al 13%. Mitocondrias de corazón (MC) y mitocondrias de pulmón (MP) de rata solubilizadas a 2.5 mg DDM/mg proteína. Tinción con Coomassie o de Bencidina y su respectivo Perfil densitométrico (Subíndice 1). Carril A: 100µg de proteína de Mitocondrias de corazón, tinción de Coomassie; Carril B: 100µg de proteína de mitocondrias extraídas de corazón, tinción de bencidina; Carril C, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de Coomassie; Carril D: 400µg mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de bencidina; Carril E, 400µg mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de bencidina; Carril F, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.5µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de bencidina; Carril G, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de bencidina. \_\_\_\_\_ 61

Figura 40. Gel hrCNE 1D de mitocondrias extraídas de corazón de rata. \_\_\_\_\_ 63

- Figura 41. Gel 2D-SDS PAGE 14% de poliacrilamida tinción con plata. En la parte superior del gel se muestra el gel hrCNE 1D tinción con Coomassie de 100µg de mitocondrias extraídas de corazón de rata. Se identificaron distintas subunidades de los complejos respiratorios I-IV marcados con flechas y enumerados (ver tabla 5). En la parte superior se indican los componentes del gel hrCNE 1D, de acuerdo a las subunidades identificadas en el análisis del gel, detectando 6 bandas; B, I, V, C, IV y II (ver tabla 6). \_\_\_\_\_ 64
- Figura 42. Gel hrCNE 1D de mitocondrias extraídas de pulmón de rata. \_\_\_\_\_ 65
- Figura 43. Gel 2D-SDS PAGE 14% de poliacrilamida tinción con plata. En la parte superior del gel se muestra el gel hrCNE 1D tinción con Coomassie de 400µg de mitocondrias extraídas de pulmón de rata. Se identificaron distintas subunidades de los complejos respiratorios I-V marcados con flechas y enumerados (ver tabla 5). En la parte superior se indican los componentes del gel hrCNE 1D, de acuerdo a las subunidades identificadas en el análisis del gel, detectando 8 bandas; A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, V<sub>1</sub>, V<sub>F0</sub>, B, IV y II (ver tabla 7). \_\_\_\_\_ 66
- Figura 44. Gel hrCNE 1D de mitocondrias extraídas de pulmón de rata tratadas con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min . \_\_\_\_\_ 67
- Figura 45. Gel 2D-SDS PAGE 14% de poliacrilamida tinción con plata. En la parte superior del gel se muestra el gel hrCNE 1D tinción con Coomassie de 400µg de mitocondrias extraídas de pulmón de rata tratadas con 1µg de TiO<sub>2</sub> durante 30 minutos. Se identificaron distintas subunidades de los complejos respiratorios I-V marcados con flechas y enumerados (ver tabla 5). En la parte superior se indican los componentes del gel hrCNE 1D, de acuerdo a las subunidades identificadas en el análisis del gel, detectando 7 bandas; A, I, C, V<sub>1</sub>, B, IV y II (ver tabla 8). \_\_\_\_\_ 68
- Figura 46. Modelo de la composición de las bandas 1D generado a partir de la estequiometría tentativa calculada en el presente trabajo para a) Mitocondrias extraídas de corazón de rata; b) Mitocondrias extraídas de pulmón de rata; c) Mitocondrias extraídas de pulmón de rata tratadas con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 minutos. \_\_\_\_\_ 72

## Índice de Tablas

<i>Tabla 1. Intermediarios metabólicos presentes en la matriz mitocondrial del Ciclo de Krebs y la <math>\beta</math>-oxidación de los ácidos grasos.</i>	21
<i>Tabla 2. Volúmenes específicos para la cuantificación de proteína por el método de Lowry modificado.</i>	33
<i>Tabla 3. Buffers y su volumen para hacer geles hrCNE con gradiente del 4 al 13%.</i>	37
<i>Tabla 4. Buffers y su volumen para hacer geles 2D con 14% de poliacrilamida.</i>	39
<i>Tabla 5. Concentración de citocromos a, b y c</i>	41
<i>Tabla 6. Subunidades representativas de los complejos respiratorios mitocondriales.</i>	62
<i>Tabla 7. Composición de las bandas de la 1D de las Mitocondrias Extraídas de Corazón de rata.</i>	63
<i>Tabla 8. Composición de las bandas de la 1D de las Mitocondrias Extraídas de Pulmón de rata.</i>	65
<i>Tabla 9. Diferencia entre los complejos detectados por actividad en gel en mitocondrias extraídas de pulmón</i>	73

## i Abreviaturas

TiO <sub>2</sub>	Dióxido de titanio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
NP	Nanopartículas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
IARC	Agencia internacional para la investigación del cáncer
ATSDR	Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades (por sus siglas en inglés)
NIOSH	Instituto nacional para la salud y la seguridad ocupacional
ROS	Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés)
ATP	Adenosin trifosfato
ADNmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
TOM	Complejo translocasa de la membrana externa (por sus siglas en inglés)
VDAC	Canales de aniones dependientes de voltaje (por sus siglas en inglés)
AIF	Factor inductor de la apoptosis
Cu	Cobre
Zn	Zinc
SOD	Superóxido dismutasa
ANT	Translocador del nucleótido adenina (por sus siglas en inglés)
TIM	Translocasa de la membrana interna (por sus siglas en inglés)
NAD/ NADH	Nicotin adenin dinucleótido / Nicotin adenin dinucleótido reducido
CoA	Coenzima A
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
CoQ	Coenzima Q
FMN	Mononucleótidos de flavina
kDa	Kilo Daltones
FAD / FADH <sub>2</sub>	Flavin adenin dinucleótido / Flavin adenin dinucleótido reducido
SDHC	Succinato deshidrogenasa unidad C
SDHD	Succinato deshidrogenasa unidad D
TTFA	Thenoyltrifluoroacetona
BNE	Electroforesis azul nativa
COX	Citocromo oxidasa
ADP	Adenosin difosfato
Pi	Fosfato inorgánico
UUR	Gen leu-tRNA
MELAS	Encefalopatía mitocondrial
MERRF	Epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas
LHON	Neuropatología óptica hereditaria
NARP	Neuropatía, ataxia y rinitis pigmentosa
KSS	Síndrome de Kearns-Sayre
CPEO	Oftalmoplegia crónica externa
OH	Radical hidroxilo
MP	Materia particulada
KCl	Cloruro de potasio
Tris-Cl	Clorhidrato tris-hidroximetilamino
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético
AEBSF	Hidrocioruro de fluoruro de 4-(2-aminoetil bencenosulfonilo)
BSA	Albúmina

Abs	Absorbencia
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NaK	Tartrato de sodio potasio
SDS	Dodecilsulfato sódico
$\text{Cu}_4\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre (II) pentahidratado
Cit c	Citocromo c
KCN	Cianuro de sodio
CRQ	Control de reducción química
TTFA	Teniltrifluoroacetona
DBH	Decilbenzoquinol
$\text{NaN}_3$	Azida de sodio
DCPIP	2,6-Diclorofenolindofenol
PMS	Metasulfato de fenazina
DQ	Decil quinona
ANOVA	Coefficiente de variación
CV	Análisis de varianza
DDM	Dodecil maltósido
NaCl	Cloruro de sodio
hrCNE	Claros nativos de alta resolución
DOC	Desoxicolato de sodio
NTB	Azul de nitrotetrasolio
DMSO	Dimetilsulfóxido
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	Dinitrato de plomo
DTT	Ditiotreitól

## ii Dedicatorias

*Para mi familia, conformada por personas amorosas, quienes pacientemente me apoyan para realizar trabajos de excelencia.*

*Para mi padre Arturo, quien siempre ha estado presente para animarme en todo lo que me proponga, mientras mis metas se mantengan altas. También por recordarme la importancia de sentirse bien con el trabajo que uno ama.*

*Para mi madre Rebeca, por sus invaluable consejos y compañía que me ayudan a mantener la moral en alto durante esta larga aventura que es la vida. Gracias por alentarme a reconocer mis aspiraciones y esforzarme hasta lograrlas.*

*Para mi maravilloso hermano Francisco, mi mano derecha y compañero de aventuras. Siendo incapaz de expresar tanto agradecimiento y cariño que le tengo, le doy las gracias por todo el amor que me tiene, así como por siempre estar para mí.*

*Para mi abuelo Juan José, por sus cálidas miradas y sus sonrisas que iluminan mi día.*

*Para el Dr. Sergio Gonzáles, cuyas enseñanzas sobre la vida, los estudios y el amor a la ciencia siempre estarán presentes en mi memoria.*

### iii Agradecimientos

*A la familia Galicia-García, por animarme, cada uno a su manera y estilo en todo lo que me propongo.*

*A la familia Damián-García por siempre estar presentes y atentos, dispuestos a ayudarme.*

*A las familias Garcia-Gutierrez, Garcia-Linares, Arriola-García y Torquemada-Vázquez, por ser tan lindos y cariñosos conmigo, siempre dispuestos a darme buenos consejos.*

*A Marco, René, Fernanda, Greta, Bruno y Amanda, por ser unos primos extraordinarios.*

*A Michael Justin Allen Sexton.*

*Hoy y siempre los guardo con cariño en mi mente.*

*A la Universidad Nacional Autónoma De México.*

*A todos los profesores de Biología en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por haber dejado una huella muy profunda en mi mente. Con sus enseñanzas y pasión me han orientado a ser mejor cada día, ayudándome a ser la persona que soy ahora.*

*A los Doctores Serio Gonzales, Ignacio Peñalosa, Gabriel Camarena, y la Maestra en Ciencias Josefina Vázquez quienes me permitieron aprender mucho acerca de la biología como ciencia práctica al permitirme participar en sus diversos proyectos de investigación.*

*A mis compañeros de carrera, por su amistad y compañerismo. En especial a Donovan, Ricardo, Toño, Victor, Led, Ana, y Gerardo.*

*Un agradecimiento además a Tecilli Cabellos por su ayuda técnica durante el trabajo de tesis, y sobre todo, por su amistad*

*A los Doctores Hugo Perales, Roberto Velasco, Martha Salcedo e Irasema Chirino por sus sabios consejos y comentarios para mejorar el presente trabajo.*

*Agradezco a mi asesora de Tesis, Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid, por sus enseñanzas y la oportunidad de trabajar en este proyecto.*

*A los proyectos DGAPA-UNAM IN221611, CONACYT 102102 y PAPCA No 3 (2011) por todo el apoyo económico necesario para concluir este trabajo de tesis.*

#### iv Resumen

Desde que el uso y desarrollo de nanomateriales para la industria en distintas áreas ha cobrado gran importancia tanto económica como tecnológica, también ha sido objeto de una intensa actividad de investigación con respecto a sus efectos en la salud humana (Maynard et al., 2006; Oberdörster, Oberdörster, & Oberdörster, 2005). Así, se tienen indicios sobre la interacción de estos materiales con distintos componentes biológicos, entre ellos el  $\text{TiO}_2$  (Bhattacharya et al., 2009; Hamilton et al., 2009; Nel et al., 2009). Éste nanomaterial ha sido estudiado a profundidad en los dos tejidos más expuestos, la epidermis (Shukla et al., 2011) y el sistema respiratorio (Kobayashi et al., 2009), siendo este último significativo debido a que no solo está expuesto a los nanomateriales por ser una vía de entrada, sino también por recibir todo el gasto cardiaco (Card, Zeldin, Bonner, & Nestmann, 2008). Se ha demostrado que durante la exposición a nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  éstas pueden introducirse a la célula (Corneanu & Craciun, 2010) e incrementar la producción de ROS (Johnston et al., 2009; Shukla et al., 2011). Sin embargo aún es necesario profundizar el conocimiento sobre su efecto en la función mitocondrial, principal fuente de ROS y organelo relacionado ampliamente con procesos cancerígenos. En este sentido, el objetivo del presente proyecto de tesis de licenciatura se enfoca en obtener más datos acerca del efecto *in vitro* de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  en la actividad de los complejos respiratorios de mitocondrias extraídas de pulmón de rata y su asociación supramolecular.

Se midió la actividad *in vitro* de los cuatro complejos respiratorios de mitocondrias extraídas de pulmón expuestas durante 30 minutos a  $0.2\mu\text{g}$  de  $\text{TiO}_2/\text{mg}$  de proteína, durante 60 minutos a  $12\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 60 minutos durante 30 minutos a  $0.2\mu\text{g}$  de  $\text{TiO}_2/\text{mg}$  de proteína y a continuación a un reto oxidante durante 60 minutos con  $12\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estas mediciones se hicieron en ausencia y presencia de SOD y Catalasa. El complejo II fue susceptible a generar ROS en presencia de los tratamientos con  $\text{TiO}_2$ . La actividad del complejo III se vio disminuida en presencia de los tratamientos con  $\text{TiO}_2$ , debido a la formación de ROS que tiene la capacidad de oxidar rápidamente el sustrato.

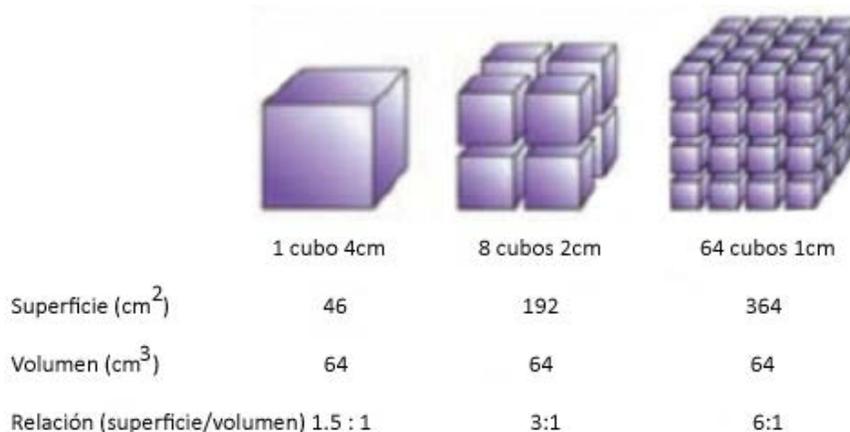
Se pudo evaluar el efecto que causa el  $\text{TiO}_2$  sobre la asociación supra molecular de los complejos respiratorios con actividades en gel hrCNE y análisis de geles 2D de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con  $0.1\mu\text{g}$   $\text{TiO}_2/\text{mg}$  proteína,  $0.5\mu\text{g}$   $\text{TiO}_2/\text{mg}$  proteína y  $1\mu\text{g}$   $\text{TiO}_2/\text{mg}$  proteína durante 30 minutos. El daño generado por NP  $\text{TiO}_2$  en los complejos I, y IV corresponden a la pérdida de actividad en gel, manteniendo su asociación supramolecular. Se encontró que las mitocondrias tratadas con NP  $\text{TiO}_2$  poseen tentativamente un dímero del complejo III, el cual ha sufrido pérdida de subunidades.

# 1. Introducción

## 1.1 Nanopartículas

Las nanopartículas (NP) se definen como aquellos materiales cuyas tres dimensiones son menores a los 100nm, las cuales se diferencian de los nanomateriales, definidos como aquellos que poseen componentes estructurales menores a 1µm en al menos una de sus dimensiones (Buzea, Pacheco, & Robbie, 2007). Estas dos clases de materiales son estudiados, controlados y manipulados en un campo de las ciencias aplicadas, llamado nanotecnología, siendo ésta considerada como una de las nuevas tecnologías más prometedoras llegando a ser actualmente una de las principales industrias en países desarrollados como Estados Unidos, Japón e Inglaterra, así como en países en desarrollo como Argentina, España y China (Comisión de las Comunidades Europeas, 2004). En Europa se calcula un impacto económico de 292,000 millones de dólares en 2010, y 1,000,000 millones de dólares para el 2015 en productos industriales, de consumo y médicos, por lo que la investigación y desarrollo de nanomateriales para la industria en distintas áreas ha sido muy importante. Para satisfacer estas necesidades en los últimos años se han fabricado, caracterizado y manipulado estructuras artificiales, con la finalidad de controlar sus características a niveles nanométricos ( $10^{-9}$  metros) (Maynard et al., 2006; Sager & Castranova, 2009)

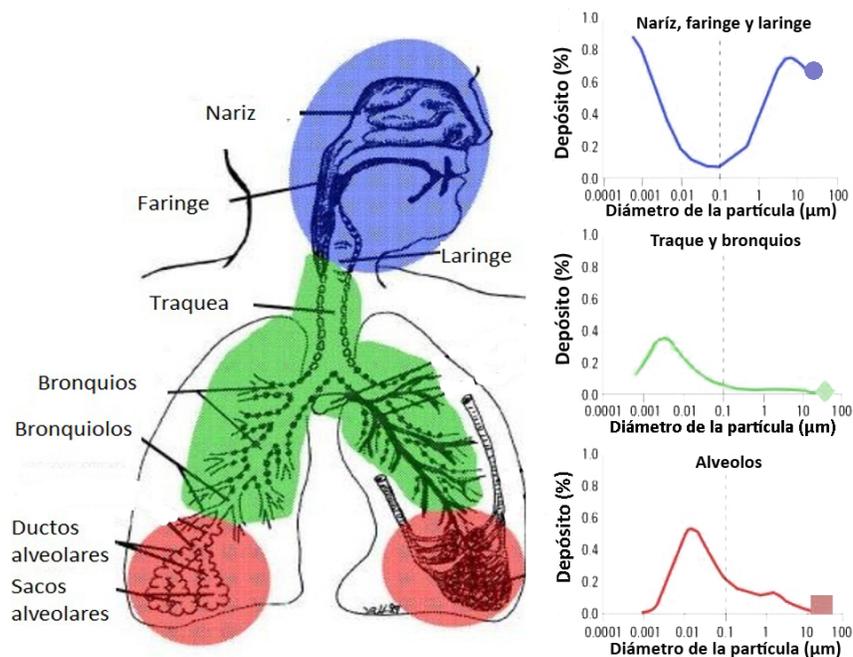
Los nanomateriales, deben constar de propiedades eléctricas, de fortaleza, conductividad, respuesta óptica, elasticidad y resistencia muy específicos para su uso (Schmid, 2011). Es importante recalcar que un material puede llegar a cambiar algunas de sus características, así como su interacción con el medio y otros compuestos al ser exhibido como nanopartícula (NP) (Xia et al., 2006), debido principalmente a que presentan una mayor superficie de contacto por unidad de masa *Figura 1* (Nel et al., 2009). Así que existe la posibilidad de que algunas de sus nuevas características resulten en interacciones imprevistas que puedan dañar la salud o el medio ambiente, por lo que es importante realizar estudios de toxicidad (Maynard et al., 2006).



*Figura 1. Un cubo de 4cm tiene un volumen igual a 64 cubos de 1cm, sin embargo, presenta una superficie de contacto menor. Así según el tamaño, un material de masa igual, puede presentar una mayor superficie de contacto. Tomado de Instituto Riojano de Salud Laboral (2011).*

Se ha encontrado que el tamaño y las propiedades de las nanopartículas crean diferentes interacciones con otras moléculas incluidas las de origen biológico. Las interfaces “nano-bio” dependen de las interacciones fisicoquímicas, la cinética y los intercambios termodinámicos entre la superficie de los nanomateriales y las de los componentes biológicos, como las membranas, proteínas, DNA y fluidos biológicos (Nel et al., 2009). Dependiendo de la composición, hidrofobicidad, tamaño, carga y los efectos electrostáticos que pueda llegar a presentar serán sus interacciones con distintos componentes biológicos. Algunas de las interacciones son: adhesión a membranas de bicapa lipídica, interactuando a manera de receptor mediador de la endocitosis; formación de coronas de proteínas, que pueden llegar a causar cambios funcionales y conformacionales de la proteína (Donaldson, Stone, Clouter, Renwick, & MacNee, 2001; Harishchandra, Saleem, & Galla, 2010; Nel et al., 2009).

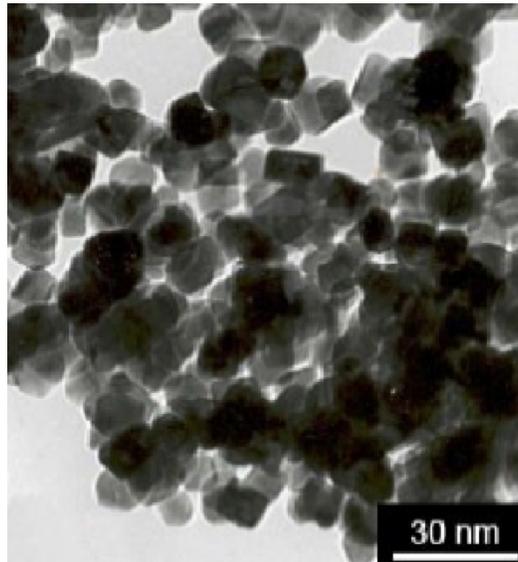
Para la identificación del peligro que pueden presentar las NP se deben conocer los mecanismos de toxicidad inducidos por la exposición. Estos dependen de la vía de exposición, la dosis, la respuesta del organismo, la susceptibilidad y las propiedades fisicoquímicas específicas de las partículas. La exposición primaria a las NP puede producirse a través de los pulmones, la piel o el intestino, siendo la respuesta distinta en cada uno de ellos. Dado que el sistema respiratorio es un importante punto de entrada de NP en el organismo, siendo los pulmones un sitio de acumulación es necesario conocer los mecanismos que relacionan las características fisicoquímicas de las NP, y los efectos adversos para un mejor evaluación del riesgo de exposición pulmonar, ya que inclusive el diámetro de las partículas influye en el depósito de las mismas *Figura 2*, (Oberdörster et al., 2005; Tran, 2009).



*Figura 2. Lugares de depósito de partículas inhaladas en las regiones nasofaríngea (○), traqueo bronquial (◇) y alveolar (□) del aparato respiratorio de humano durante la respiración nasal. Modificado de Oberdorster et al. (2005).*

### 1.2 Dióxido de Titanio ( $TiO_2$ )

El dióxido de titanio ( $TiO_2$ ) (>100nm) es un compuesto químico muy utilizado desde el siglo XX como pigmento en la industria de alimentos y de la cerámica. Actualmente es uno de los nanomateriales más comercializados *Figura 3*, duplicándose su producción de 5,000 toneladas métricas al año en el 2006, a 10,000 toneladas métricas en 2011, esperándose llegue a 2.5 millones de toneladas métricas para el año 2025 (Robichaud, Uyar, Darby, Zucker, & Wiesner, 2009). Como nanomaterial, tiene aplicaciones catalíticas y fotocatalíticas en superficies de auto limpieza, aerosol desinfectante, tratamientos de agua y como electrodos en celdas solares; como pigmento blanco en pinturas, papel, tintas, pasta dental, y como protector solar, por sus propiedades absorbentes de la luz (Comisión de las Comunidades Europeas, 2004; Fujishima, Rao, & Tryk, 2000).



*Figura 3. Nanopartículas de la forma anatasa de  $TiO_2$  (15nm). Tomado de Comisión Europea (2012).*

En un modelo de la concentración de nanopartículas suspendidas en el aire, se estimó que en los Estados Unidos de América y Europa, las concentraciones de  $TiO_2$  eran de  $0.0005\mu g/m^3$  (Gottschalk, Sonderer, Scholz, & Nowack, 2009). Según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), la respuesta tumoral a la presencia de  $TiO_2$  es inespecífica, y se necesita un periodo de exposición largo, por lo que ha sido catalogado como posible cancerígeno en los humanos (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1997); en el 2005 el Instituto Nacional para la Salud y la Seguridad Ocupacional (NIOSH por sus siglas en inglés) recomendó una exposición límite de  $0.1mg/m^3$  para partículas ultrafinas (<100nm) de  $TiO_2$ , mientras que el límite para partículas finas (>100nm) de  $TiO_2$  es de  $1.5mg/m^3$ ; esto para exposiciones mayores de 10 horas al día/ 40 horas por semana (National Institute for Occupational Safety and Health, 2005).

Las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, han sido estudiadas a profundidad en los dos tejidos más expuestos, la epidermis (Shukla et al., 2011) y el sistema respiratorio (Kobayashi et al., 2009), siendo este último significativo debido a que no solo está expuesto a los nanomateriales por ser una vía de entrada, sino también por recibir todo el gasto cardiaco (Card et al., 2008). Siendo demostrada la inflamación moderada (Grassian, O'shaughnessy, Adamcakova-Dodd, Pettibone, & Thorne, 2007), inflamación crónica y las lesiones de tipo efisema pulmonar (Chen et al., 2006) ante la exposición a nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. Así mismo la exposición *in vitro* de células epiteliales de pulmón a concentraciones de 20 a 40mg/ul de TiO<sub>2</sub> provoca respuestas inflamatorias en la células (Park et al., 2008).

Se ha probado que la presencia de TiO<sub>2</sub> incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas en inglés) a la vez que decrece la respuesta al estrés oxidativo (Johnston et al., 2009). En el 2009 Bhattacharya y colaboradores encontraron que concentraciones de 10 y 50 µg/cm<sup>2</sup> de TiO<sub>2</sub>, en un periodo de exposición de 7 horas, provoca un incremento significativo en la producción de ROS. Shukla y colaboradores (2011), determinaron que existe un aumento significativo en la producción de ROS por células de la línea celular de cáncer epidérmico A431, luego de una exposición a 0.8, 8 y 80µg/ml de TiO<sub>2</sub> durante 6 horas.

En 2010, Corneanu & Craciun encontraron que luego de inyectar ratones hembra 5 veces con 0.01% de NP TiO<sub>2</sub> se presentan alteraciones metabólicas y ultra estructurales, donde las mitocondrias se encontraron hinchadas con alteraciones en las crestas de células hepáticas. Freyre-Fonseca y colaboradores (2011) al trabajar con mitocondrias aisladas de pulmón de rata, encontraron una disminución significativa en el control respiratorio y en el potencial de membrana en presencia de 10µg de TiO<sub>2</sub>/ mg de proteína.

### 1.3 La Mitocondria

La mitocondria es un organelo celular de 3 a 4 µm de largo por ~1µm de ancho, delimitadas por un juego de doble membrana (Plattner & Hentschel, 2001). Presenta una membrana externa y una interna, siendo ésta última, quien presenta pliegues o crestas hacia la matriz mitocondrial que le permiten aumentar la superficie y la capacidad bioquímica (Scheffler, 2011) *Figura 4*. Así, la mitocondria puede dividirse en 4 partes: membrana externa, espacio intermembranal, membrana interna y matriz mitocondrial (Plattner & Hentschel, 2001).

La función principal de la mitocondria es la de producir Adenosín Trifosfato (ATP) para lo cual lleva a cabo la respiración celular, proceso en el que el oxígeno es reducido a agua. Requiere mantener un gradiente electroquímico, generado a través del paso de electrones entre los complejos respiratorios, complejos multiprotéicos ubicados en la membrana interna mitocondrial. Acoplado a este transporte de electrones, existe uno de protones que utiliza la ATPsintasa para la formación de ATP (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2006; Lodish et al., 2007; Mathews, Ahern, & Holde, 2002).

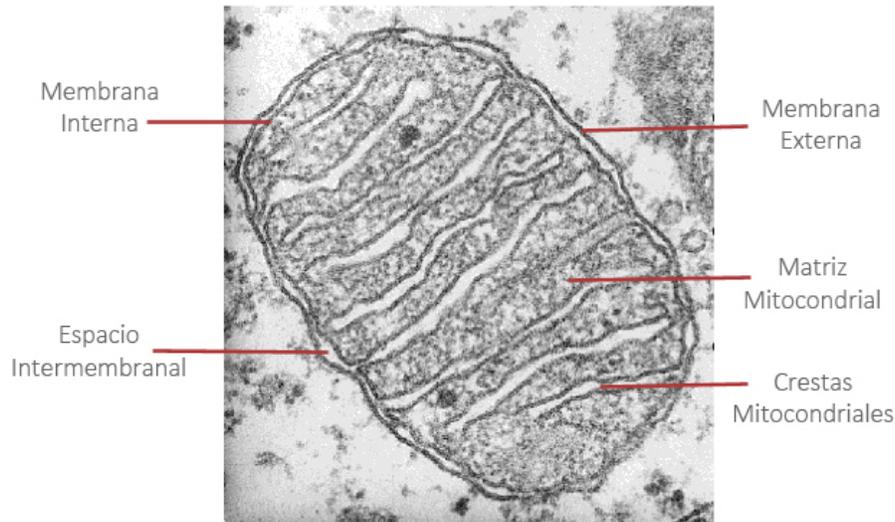


Figura 4. Fotografía de una mitocondria de célula pancreática obtenida en microscopio electrónico ( $\times 190,000$ ) en la que se señalan las cuatro partes en que se divide la mitocondria: membrana externa, espacio intermembranal, membrana interna (la cual se pliega formando crestas mitocondriales) y la matriz mitocondrial. Modificado de Scheffler (2008).

El número de mitocondrias presentes en cada célula varía, según qué tan especializada sea ésta (Plattner & Hentschel, 2001); por ejemplo, se estima que un hepatocito tiene ~800 mitocondrias, mientras un ovocito tiene >100,000 mitocondrias (Scheffler, 2011). Además es el único organelo, aparte del núcleo, que presenta su propio material genético, el ADNmt (ácido desoxirribonucleico mitocondrial), que cuenta con 37 genes que codifican para 13 péptidos que forman parte de los complejos respiratorios I, III, IV y V, 2 ARNr (ácido ribonucleico ribosomal) y 22 ARNt (ácido ribonucleico de transferencia). Así, más del 99% de las proteínas mitocondriales se encuentran codificadas en el núcleo, se sintetizan en el citoplasma y se transportan al interior mitocondrial (Pestronk, 2012).

### 1.3.1 Membrana Externa

La membrana externa mitocondrial está compuesta por un 60% de lípidos y un 40% de proteínas. Presenta colesterol como componente fosfolipídico importante. Presenta proteínas del complejo translocasa de la membrana externa (TOM por sus siglas en inglés). Ésta presenta subunidades integrales, translocadoras, chaperonas y estabilizadoras cuya función es identificar y transportar a través de la membrana a los péptidos mitocondriales que posean la secuencia blanco en su extremo N-terminal (Pestronk, 2012).

Los canales de aniones dependientes de voltaje (VDAC, por sus siglas en inglés), permiten la difusión de algunos iones así como algunas otras moléculas entre el citosol y el espacio intermembranal. Forman parte de los complejos proteicos más abundantes en la membrana externa (Pestronk, 2012). También se encuentran las proteínas de la familia *Bcl-2*, que regulan la permeabilidad membranal, impidiendo la liberación del citocromo *c* y el factor inductor de la apoptosis (AIF, por sus

siglas en inglés) a través de los VDAC. Evitando así la formación del apoptosoma y el desencadenamiento de la cascada de las caspasas; proteasas de cisteína efectoras de la apoptosis. Su sobreexpresión, también se ha visto relacionada con un aumento de los niveles y la actividad de la superóxido dismutasa CuZn (SOD I)(Luna-López, 2008; Pestronk, 2012).

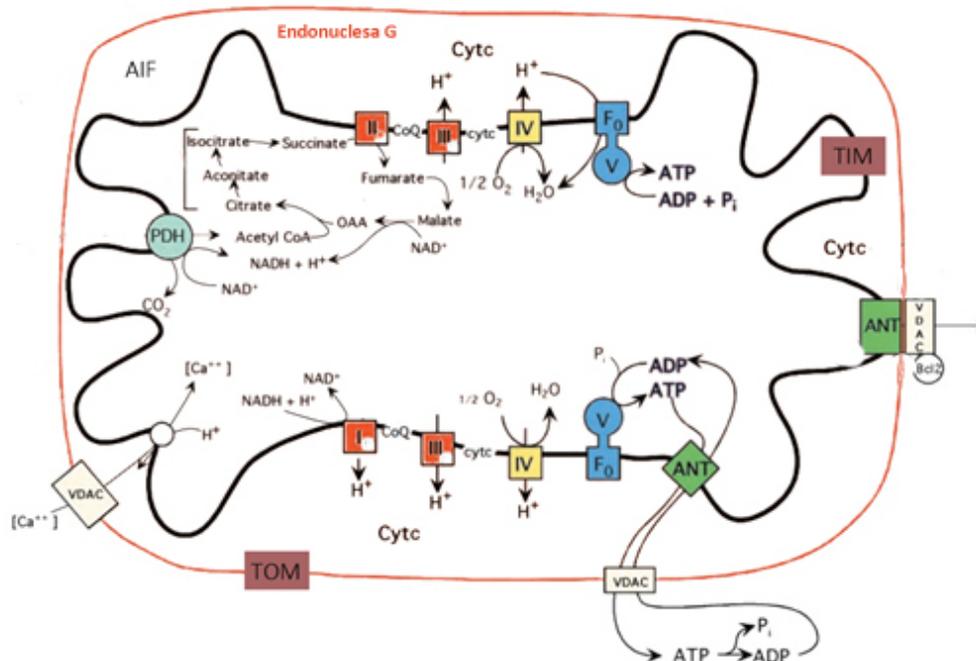


Figura 5. Esquema de una mitocondria señalando las proteínas de que se compone en sus membranas interna, externa, espacio intermembranal y matriz mitocondrial. Calcio ( $Ca^{++}$ ), Oxígeno ( $O_2$ ), isocitrato, cetoglutarato, succinato, fumarato, malato, oxalacetato (OAA), nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), acetil coenzima A (Acetil CoA), citrato, aconitato, dióxido de carbono ( $CO_2$ ); piruvato deshidrogenasa (PDH); complejos I, II, III, IV, V y subunidad  $V_{FO}$ ; coenzima Q (CoQ); translocador del nucleótido adenina (ANT); translocador de la membrana interna (TIM), endonucleasa G; factor inductor de apoptosis (AIF); translocador de la membrana externa (TOM); canal dependiente de voltaje (VDAC); adenosin difosfato (ADP); fosfato inorgánico ( $P_i$ ); adenosin trifosfato (ATP); Modificado de Wallace (1999)

### 1.3.2 Espacio Intermembranal

En este se encuentran proteínas como el factor inductor de apoptosis, el citocromo  $b_2$ , y la endonucleasa G, siendo el citocromo c la proteína más importante y característica de este espacio (Mathews et al., 2002; Pestronk, 2012). Durante el transporte de electrones, se translocan protones hacia el espacio intermembranal, una vez aumentada a la concentración de protones y la acidez del espacio intermembranal, se genera una fuerza protón motriz que se utiliza para la síntesis de ATP (Melo-Ruiz & Cuamatzi-Tapia, 2007).

### 1.3.3 Membrana Interna.

La membrana interna mitocondrial está compuesta por un 20% de lípidos y un 80% de proteínas. Su composición lipídica es baja en fosfolípidos poliinsaturados susceptibles a la lipoperoxidación y destrucción por los radicales libres producidos

en la mitocondria durante el transporte de electrones (Tsalouhidou et al., 2006). El fosfolípido con mayor presencia en la membrana interna mitocondrial es la cardiolipina (Fleischer, Rouser, Fleischer, Casu, & Kritchevsky, 1967; van Meer, Voelker, Feigenson, & Meer, 2008), que en eucariontes solo se encuentra presente en este organelo y que se ha demostrado tener una estrecha relación con el funcionamiento del complejo respiratorio I (Paradies et al., 2004), la ATPsintasa (Eble, Coleman, Hantgan, & Cunningham, 1990) y la formación de supercomplejos (Pfeiffer et al., 2003; Zhang, Mileykovskaya, & Dowhan, 2005).

Al igual que la membrana externa presenta canales de transporte, como el translocador del nucleótido adenina (ANT por sus siglas en inglés), que permite el intercambio entre ADP y ATP entre la matriz y el espacio intermembranal; sin embargo, también presenta translocadores propios de esta membrana, como lo son el complejo TIM (Translocasa de la membrana interna, por sus siglas en inglés), complejo que permite la identificación, paso y anclaje de las proteínas de la membrana interna o de la matriz mitocondrial (Pestronk, 2012), la piruvato translocasa, la ADP/ATP translocasa, el canal de potasio y transportador de calcio, la carnitina acil translocasa, la translocasa de los nucleótidos de adenina, el transportador mitocondrial de glutamato y el transportador mitocondrial de oxoglutarato (Buqué, Aspichueta, & Ochoa, 2008).

También se encuentran anclados los 4 complejos respiratorios (I, NADH deshidrogenasa; II, Succinato deshidrogenasa; III, Complejo bc<sub>1</sub>; IV, Citocromo c oxidasa) encargados del transporte de electrones que genera un gradiente electroquímico al bombear protones fuera de la matriz mitocondrial, hacia el espacio intermembranal; gradiente que utiliza el complejo V o ATP sintasa para la formación de ATP (Mathews et al., 2002).

#### 1.3.4 Matriz mitocondrial

En esta porción de la mitocondria se encuentra el DNA mitocondrial, rRNA, tRNA, intermediarios metabólicos, principalmente del ciclo de Krebs y la β-oxidación *Tabla 1*. También se encuentra la peptidasa que procesa aquellas proteínas mitocondriales importadas de el citosol (Mathews et al., 2002).

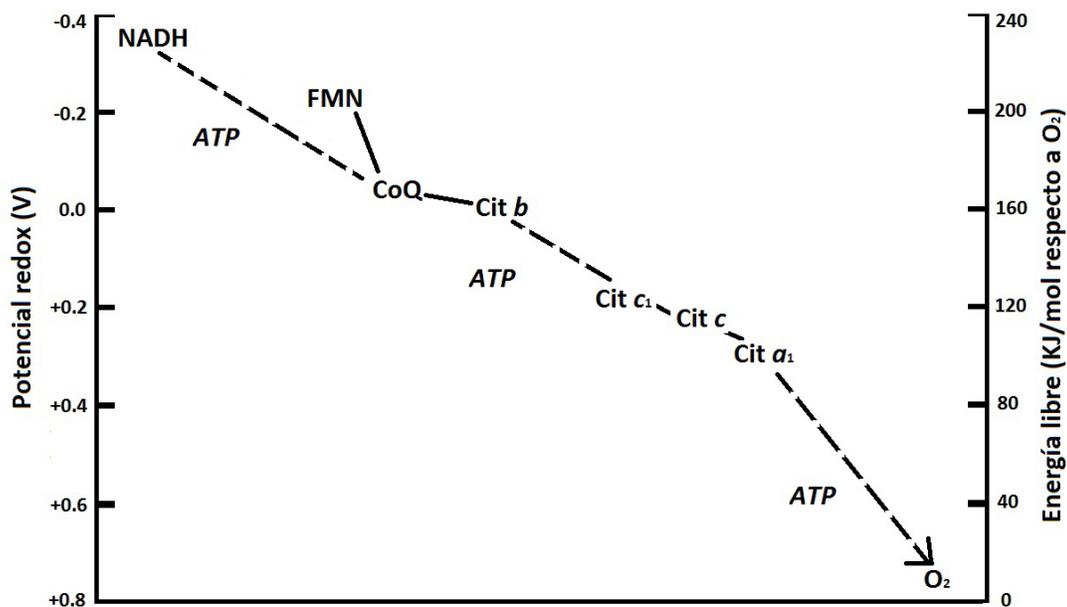
Tabla 1. Intermediarios metabólicos presentes en la matriz mitocondrial del Ciclo de Krebs y la β-oxidación de los ácidos grasos.

<b>Ciclo de Krebs</b>	<b>β-oxidación</b>
Piruvato	Acil CoA
Acetil CoA	trans-Δ <sup>2</sup> -enoil-CoA
Citrato	L-3-hidroxiacil CoA
Cis-Aconitato	3-cetoacil CoA
D-isocitrato	Acetil CoA
A-cetoglutarato	
Succinil CoA	
Succinato	
Fumarato	
Malato	
Oxalacetato	

### 1.4 La cadena de transporte de electrones

Está formada por citocromos (proteínas que tienen como grupo prostético un anillo compuesto de 4 pirroles, llamado porfirina, que encierra un átomo metálico por enlaces coordinados), centros fierro azufre (proteínas que se caracterizan por la presencia de centros de fierro-azufre que contienen grupos sulfuro unidos a centros de dos a cuatro átomos de fierro en estados de oxidación variables ) y las quinonas (transportadores electrónicos hidrofóbicos, son derivadas del benceno con dos grupos cetona) (Mathews et al., 2002).

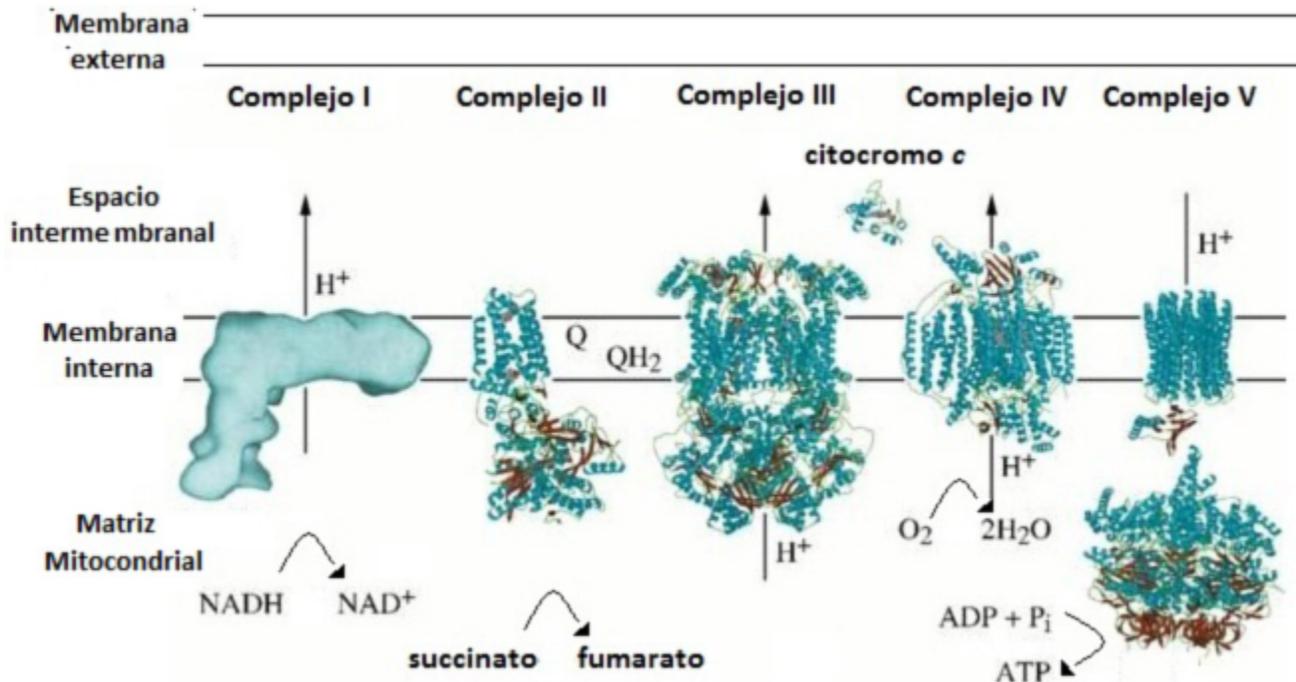
Las reacciones de óxido-reducción exérgicas acopladas en las que la energía total disponible de la oxidación del NADH por el  $O_2$  se libera en una serie de pequeños pasos, los cuales son suficientemente exérgicos para generar 31kJ/mol necesarios para impulsar la síntesis de ATP. Estos pasos están determinados por donadores de electrones que se encuentran en un arreglo del más negativo hasta el más positivo y que es la manera en que los electrones tienden a pasar del NADH al  $O_2$ , *Figura 5* (Mathews et al., 2002).



*Figura 6. Dirección del flujo de electrones y relaciones energéticas en la cadena espiratoria. Existen tres etapas cuya en las que se producen decrementos de energía libre relativamente grandes al circular los electrones, superiores a los 31kJ/mol, que es el valor para la hidrólisis del ATP: FMN -> CoQ, cit b -> cit c<sub>1</sub> y cit a -> O<sub>2</sub>. Modificado de Mathews et al., (2002).*

La cadena de transporte de electrones cuenta con dos deshidrogenasas, las cuales reciben electrones de la oxidación de diferentes sustratos; NADH (Complejo I) y succinato (Complejo II). Los electrones pasan a un transportador electrónico lipídico, la coenzima Q (CoQ), que se desplaza libremente por la porción hidrofóbica membranal. El complejo III oxida la forma reducida de la coenzima Q (ubiquinol) y reduce a su vez al citocromo c, un transportador electrónico proteico que puede desplazarse por el espacio intermembranal. Posteriormente la citocromo oxidasa (Complejo IV) acopla la oxidación del citocromo c con la reducción del  $O_2$  a agua. La energía liberada por estas reacciones exérgicas crea un gradiente de

protones a través de la membrana interna por parte de los complejos I, III y IV hacia el espacio intermembranal. Luego los protones regresan a la matriz mitocondrial pasando por el canal  $F_0$  de la ATPsintasa (Complejo V). La energía liberada por este proceso exergónico impulsa la síntesis endergónica de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico *Figura 6* (Berg et al., 2006; Lodish et al., 2007).



*Figura 7. Esquema de la cadena de transporte de electrones y de la translocación de protones, que se lleva a cabo en la membrana interna mitocondrial, para la síntesis de ATP durante la respiración celular. Se muestran los cuatro complejos respiratorios, la CoQ, el citocromo c y la ATPasa (Complejo V). Modificado de Rea (2012).*

#### 1.4.1 Complejo I

También llamado NADH:ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa es el primero de los tres complejos respiratorios translocadores de protones. Lleva a cabo la función de transferir dos electrones del NADH a la ubiquinona, translocando cuatro protones a través de la membrana interna mitocondrial hacia el espacio intermembranal. Se trata de un complejo grande, en eucariontes cuenta con 46 subunidades distintas, un mononucleótido de flavina (FMN) y algunos centros fierro-azufre, que transfieren los electrones desde la flavina reducida hacia la coenzima Q, componentes que le dan un peso molecular de  $\approx 1000$  kDa (Brandt, 2006; Mathews et al., 2002; Vedel et al., 1999; Wittig, Karas, & Schagger, 2007).

Su estructura general tiene una forma de bota o "L" dividida en una porción hidrofóbica, embebida en la membrana interna mitocondrial y una porción hidrofílica extendida hacia la matriz mitocondrial. Esta última posee un sitio de unión y oxidación del NADH, así como los centros fierro-azufre que facilitan el transporte de electrones de la porción hidrofílica a la

porción hidrofóbica del complejo. La porción hidrofóbica contiene las 7 subunidades, codificadas en el ADNmt, embebidas en la membrana interna mitocondrial, donde ocurre la reducción de la coenzima Q (Pestronk, 2012).

La rotenona, inhibidor específico para el complejo I, posee un porcentaje de inhibición de entre el 60 y el 80%, según sea el tejido. Ésta se ancla en el sitio de unión a la CoQ, evitando su unión al centro de reducción y permitiendo el flujo de los electrones directamente al oxígeno molecular, provocando un aumento en la producción de ROS (Bénit et al., 2006; Fato et al., 2009)

#### 1.4.2 Complejo II

El complejo II (Succinato:Coenzima Q reductasa o Succinato deshidrogenasa) es la única proteína del ciclo de Krebs que actúa en todos los organismos aerobios como una proteína membranal de la cadena respiratoria. Puede transferir electrones directamente del succinato a su dinucleótido de adenina y flavina (FADH<sub>2</sub>) y de éste a los centros hierro-azufre que transferirán esos electrones al cit *b*, y de estos a la CoQ. Posee cuatro subunidades proteicas codificadas en el ADN nuclear y una masa molecular calculada en geles BNE (Electroforesis azul nativo por sus siglas en inglés) de 125 kDa (Hederstedt, 2003; Mathews et al., 2002; Vedel et al., 1999).

Su estructura se encuentra extendida hacia la matriz mitocondrial; la subunidad SDHA (72.7kDa), es el sitio catalítico con el cofactor FAD<sup>++</sup> unido covalentemente a la proteína. Es el lugar donde se cataliza la oxidación del succinato a fumarato, y la subunidad SDHB (30ka) que posee tres grupos hierro-azufre. La porción hidrofóbica del complejo se encuentra embebida en la membrana interna mitocondrial, donde se encuentran las subunidades SDHC (15.5kDa) y SDHD (13.5 kDa) unidas con el citocromo *b* que pasa los electrones provenientes del succinato a la CoQ (Hederstedt, 2003; Pestronk, 2012). El TTFA, inhibidor del complejo II, actúa como quelante de los centros hierro-azufre inhibiendo el 87% de su actividad (Chauveau & Roussaux, 1996).

#### 1.4.3 Coenzima Q

La coenzima Q (CoQ o Ubiquinona) es un transportador electrónico hidrofóbico ligado a las proteínas de forma laxa. Su principal función es la de concentrar los electrones desde varias deshidrogenasas flavoproteicas y pasarlos a los citocromos para su transporte final al O<sub>2</sub>. Se trata de una benzoquinona ligada a 10 unidades de isopreno (en el caso de mamíferos), lo cual le proporciona su carácter apolar que le permite la rápida difusión a través de la membrana mitocondrial interna (Mathews et al., 2002). Se puede encontrar en tres diferentes estados redox: ubiquinona (completamente oxidada), ubisemiquinona (parcialmente oxidada) y ubiquinol (completamente reducida) (Lenaz et al., 1995).

#### 1.4.4 Complejo III

El complejo III (ó complejo  $bc_1$  ó ubiquinol citocromo  $c$  oxidoreductasa), tiene la función de transferir los electrones del ubiquinol al citocromo  $c$ , acoplado a la translocación de protones. Su estructura consiste en un dímero, donde cada unidad está compuesta de un total de 11 subunidades embebidas en la membrana interna mitocondrial y cuatro centros redox; las proteínas hierro-azufre, y los citocromos  $b$  y  $c_1$ . Posee 10 subunidades codificadas en el ADN nuclear, entre los que se encuentran el citocromo  $c_1$ , la proteína hierro-azufre, dos proteínas centrales requeridas para el ensamblaje del complejo III (las subunidades 1 y 2, también llamadas core I y core II) y para la formación del complejo entre los citocromos  $c$  y  $c_1$  (Subunidad 7 y 8), 6 proteínas de bajo peso molecular que median la formación del complejo. También posee un citocromo  $b$  codificado en el ADNmt (Pestronk, 2012). Tiene una masa molecular calculada en geles BNE de 240 kDa (Mathews et al., 2002; Vedel et al., 1999).

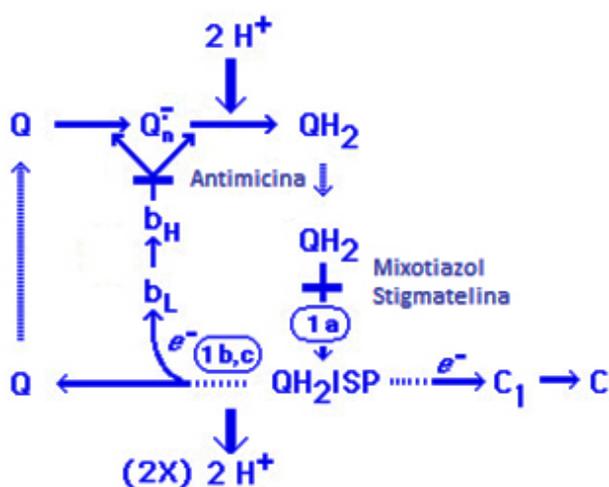


Figura 8. Esquema representativo del ciclo Q, ilustra el camino de los electrones desde el ubiquinol al citocromo  $c$  pasando por el complejo  $bc_1$  mostrando también los protones translocados a través de la membrana (imagen modificada de Trumpower (1990)).

98% de la actividad del complejo (Muller, Roberts, Bowman, & Kramer, 2003).

#### 1.4.5 Citocromo $c$

El citocromo  $c$  es un acarreador de electrones que se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria, unido a la mitocondria interna mitocondrial por atracción electrostática con las cabezas de fosfolípidos. Es un pequeño péptido de 12.38 kDa codificado en el ADN nuclear, quien posee un grupo hemo cuya función es la de transferir un electrón a la vez desde el complejo III al IV (Lenaz et al., 1995; Pestronk, 2012).

#### 1.4.6 Complejo IV

El complejo IV (Citocromo  $c$  oxidasa), es la enzima terminal de la cadena respiratoria. Cataliza la reacción de transferencia de electrones del citocromo  $c$  al oxígeno molecular, reduciendo al oxígeno en agua utilizando cuatro protones, y

translocando también cuatro protones de la matriz al espacio intermembranal. Posee dos átomos de cobre ( $\text{Cu}_A$  y  $\text{Cu}_B$ ), dos grupos hemo (tipo  $a$  y  $a_3$ ) y 13 subunidades proteicas, con una masa molecular calculada en geles BNE de 195 kDa para eucariontes (Pestronk, 2012).

Se trata de un complejo proteico embebido en la membrana interna mitocondrial, 10 de sus subunidades son codificadas por el ADN nuclear, siendo importantes para la estructura general y la regulación de la actividad del complejo, mientras que tres subunidades están codificadas en el ADNmt (COXI de 57 kDa, COXII de 35 kDa y COXIII de 30kDa). Tienen propiedades hidrofóbicas y son las subunidades catalíticas del complejo. El primer paso en la transferencia de electrones del citocromo  $c$  al oxígeno lo lleva a cabo el  $\text{Cu}_a$  presente en la subunidad COXII, quien pasa el electrón al hemo  $a$  y este a su vez al hemo  $a_3$ - $\text{Cu}_b$ , centro binuclear donde por cada 4 electrones transferidos se reduce una molécula de  $\text{O}_2$  a agua (Pestronk, 2012). El cianuro, inhibe la actividad del complejo entre un 96-98.9% (Slater, 1967).

#### 1.4.6 Complejo V

La ATPsintasa ( $F_1F_0$  ATPasa o Complejo V), es la enzima encargada de utilizar la fuerza protón motriz generada por la translocación de 3 protones a través de la membrana interna mitocondrial, para sintetizar una molécula de ATP a partir de adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi), con la capacidad de llevar a cabo la reacción contraria (hidrólisis del ATP) *Figura 8* (Mathews et al., 2002; Vedel et al., 1999). Se divide en dos grandes partes, la porción  $F_1$  que es una proteína globular soluble en agua, y la  $F_0$ , fracción hidrofóbica embebida en la membrana interna mitocondrial. En bovino están compuestas de un total de 16 diferentes subunidades *Figura 8b*, dos de ellas codificadas en el ADNmt (subunidades  $a$  y  $A_6L$ ), con una una masa molecular aproximada de 700 kDa en geles BNE (Buchanan & Walker, 1996; Dabbeni-sala, Rai, & Lippe, 2011; Pestronk, 2012).

La porción  $F_1$  usa el gradiente de protones para generar la fuerza motriz, ya que contiene los sitios catalíticos de unión de ADP y Pi, compuesta de 6 subunidades, las subunidades  $\alpha$  de 55kDa,  $\beta$  de 52kDa,  $\gamma$  de 30kDa  $\delta$  de 15kDa,  $\epsilon$  de 5.6kDa y IF1 de 10kDa (Buchanan & Walker, 1996; Domínguez Ramírez & Tuena de Gómez Puyou, 2005; H Schägger & Pfeiffer, 2001), las cuales se encuentran presentes en la Porción  $F_1$  con la siguiente estequiometría  $\alpha_3:\beta_3:\gamma:\delta:\epsilon:IF1$  (Pestronk, 2012). Tiene tres sitios catalíticos colocados en las interfaces de las subunidades  $\alpha\beta$ , las cuales presentan asimetría por la ocupación diferente de nucleótidos, donde dos sitios pueden tener ADP y Pi o ATP y un tercero que puede estar libre, cada uno de los tres sitios presenta cambios conformacionales alternadamente, producidos por cambios de afinidad a los nucleótidos, dando una cinética de cooperatividad, suponiendo la acción de un catalizador rotatorio. Esos segmentos se encuentran unidos a la porción  $F_0$  por un eje móvil o rotor formado por las subunidades  $\gamma\delta\epsilon$ , el cual se mueve sin fricción dando un ciclo de rotación de  $360^\circ$  en sentido de las manecillas del reloj al sintetizar 3ATP o en sentido contrario al hidrolizarlas (Domínguez Ramírez & Tuena de Gómez Puyou, 2005).

La porción  $F_0$  se encuentra formada de 10 subunidades hidrofóbicas, dos de ellas codificadas en el ADNmt (a de 24kDa y  $A_6L$  de 7.9kDa), y 8 en el ADN nuclear (b de 25kDa,  $c_{12}$  de 7.6kDa, d de 18kDa, e de 8.1kDa, f de 10kDa, g de 11kDa, OSCP de 20kDa,  $F_6$  de 8.9kDa) (Domínguez Ramírez & Tuena de Gómez Puyou, 2005; Pestronk, 2012). Está formada por un oligómero en forma de cilindro hueco formado por 12 subunidades  $c$  unidas a las subunidades  $aefgA_6L$  a través de las cuales se da el transporte de protones. Las subunidades  $aA_6L$  dan estabilidad a los rotores ( $\alpha\beta$ ) gracias a la presencia de un estator lateral formado por las subunidades  $bdF_6OSCP$  (Domínguez Ramírez & Tuena de Gómez Puyou, 2005).

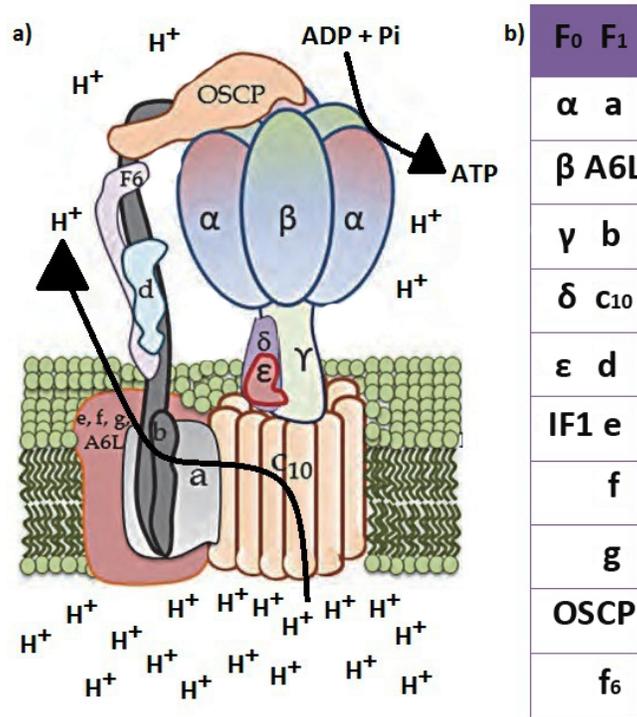


Figura 9. a) Esquema de la ATP sintasa y sus subunidades durante la síntesis de ATP. b) Tabla de las subunidades pertenecientes a la porción  $F_1$  (porción membranal) y  $F_0$  (porción soluble) de la ATP sintasa. Modificada de Dabbeni-Sala (2011).

#### 1.4.7 Organización de la cadena respiratoria

Para intentar explicar la organización e interacciones necesarias entre los complejos respiratorios para mantener el flujo de electrones, se han propuesto diversos modelos. El modelo del estado fluido que postula la presencia de los complejos respiratorios de forma difusa e individual, donde la transferencia de electrones depende de la interacción dada por colisiones aleatorias entre los complejos respiratorios, la CoQ y el cit  $c$ , Figura 9a (Dudkina, Sunderhaus, Boekema, & Braun, 2008; Smits, Smeitink, & van den Heuvel, 2010). Por otro lado, el modelo del estado sólido, postula la interacción estable entre los complejos de la cadena respiratoria en supercomplejos definidos Figura 9b (Dudkina et al., 2008; Smits et al., 2010). Actualmente se plantea la posibilidad de un modelo integrado, debido a la presencia de supercomplejos definidos, así como a la presencia de monómeros de algunos complejos respiratorios en la membrana Figura 9c (Dudkina et al., 2008; Smits et al., 2010).

Durante la última década se han publicado un gran número de evidencias a favor del modelo del estado sólido, como la separación de los supercomplejos por electroforesis en condiciones nativas (Acín-Pérez et al., 2004; Dudkina et al., 2008; H Schägger & Pfeiffer, 2001), la actividad en gel de los complejos respiratorios en arreglos de supercomplejos (Wittig et al., 2007; Zerbetto, Vergani, & Dabbeni-Sala, 1997) y el consumo de oxígeno por aquellos supercomplejos que presentan los elementos necesarios para el transporte de electrones desde NADH al oxígeno molecular (Acín-Pérez et al., 2004). También se han presentado imágenes de Microscopía electrónica apoyando el modelo (Althoff, Mills, Popot, & Kühlbrandt, 2011; Dudkina, Kouril, Peters, Braun, & Boekema, 2010), así como la estructura por rayos X del supercomplejo I<sub>1</sub>, III<sub>2</sub>, IV<sub>1</sub> de 1700kDa (Althoff et al., 2011). Otra de las evidencias más claras sobre la existencia de supercomplejos son los oligómeros de ATPasa, como los dímeros de ATPasa que forman un ángulo de entre 35 y 90° al unir ambas porciones F<sub>0</sub> (porción embebida en la membrana interna mitocondrial) teniendo un papel muy importante en la formación de las crestas mitocondriales (Dudkina et al., 2010).

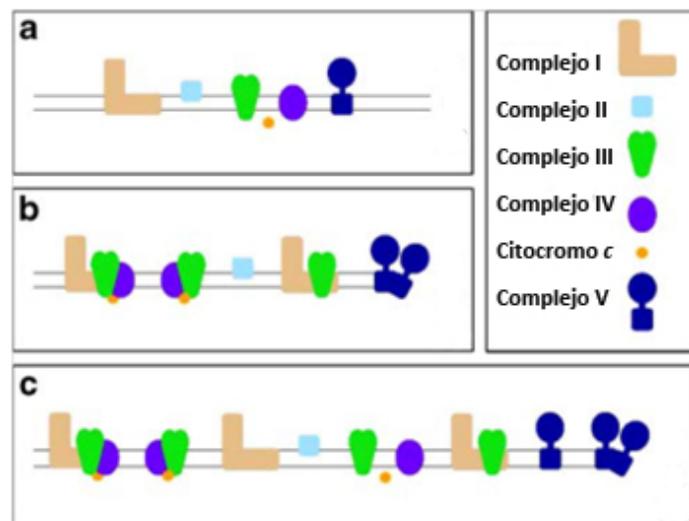


Figura 10. Modelos de la organización de los complejos respiratorios. a) Modelo del estado fluido, b) Modelo del estado sólido con los supercomplejos, c) Modelo integrado. M matriz; IM membrana interna; IMS espacio intermembranal. Tomado de Dudkina et al. (2008)

En mitocondrias extraídas de corazón de bovino y de hígado de rata se han reportado en geles BNE dímeros y monómeros de ATP sintasa, monómeros del complejo I, del complejo IV y dímeros de los complejos III y IV, así como los supercomplejos I<sub>1</sub>+III<sub>2</sub>+IV<sub>0-4</sub>, I<sub>1</sub>+IV<sub>1</sub>, III<sub>2</sub>+IV<sub>1-2</sub>. En base a la relación estequiométrica presente entre los complejos II y III, se ha postulado la presencia de monómeros y dímeros del complejo II (Acín-Pérez et al., 2004).

Se han reportado algunos factores que influyen en la estructura y formación de los supercomplejos, uno de los más importantes es la relación de los complejos respiratorios con los fosfolípidos presentes en la membrana interna mitocondrial (Bogdanov, Mileykovskaya, & Dowhan, 2008). Un fosfolípido en particular, la cardiolipina, presenta un rol muy

importante en la asociación de los complejos formando supercomplejos respiratorios (Bogdanov et al., 2008; Gohil et al., 2004), como en el caso del complejo III y IV en mitocondrias de levadura (Zhang et al., 2005). Se ha demostrado que existe una dependencia entre la eficiencia energética del sistema respiratorio mitocondrial con respecto a los niveles de cardiolipina presentes en la membrana (Bogdanov et al., 2008).

#### *1.4.8. Deficiencias en la cadena de transporte de electrones*

Los trastornos mitocondriales son un grupo heterogéneo de enfermedades que se deben a fallos en la cadena respiratoria mitocondrial. Los trastornos mitocondriales pueden ser causados por defectos del DNA nuclear o del DNAm. Los defectos genéticos nucleares pueden heredarse de una forma tanto autosómica dominante como recesiva. Los defectos del DNAm se transmiten por herencia materna. Muchos pacientes presentan un conjunto de fallos clínicos que terminan en un síndrome específico; sin embargo, a menudo hay mucha variabilidad clínica (Pestronk, 2012).

Los desórdenes relacionados a cambios genéticos pueden tener varias razones, como lo son mutaciones puntuales, como A3243G y T8993C en el gen leu-tRNA (UUR), que causa la encefalopatía mitocondrial (MELAS, por sus siglas en inglés), A8344G y T8356C en el gen del tRNA-lys que causa epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas (MERRF, por sus siglas en inglés); mutaciones G4560A y G11778A que causan neuropatología óptica hereditaria (LHON, por sus siglas en inglés), y T8993C en la subunidad 6 del gen ATPasa que causa neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP, por sus siglas en inglés). También pueden ser causados por deleciones, donde encontramos una de las más comunes, causas del síndrome de Kearns-Sayre (KSS, por sus siglas en inglés); otras razones son las deleciones múltiples, que causan oftalmoplegia crónica externa progresiva (CPEO, por sus siglas en inglés) o síndrome de Pearson (Pestronk, 2012).

En el Centro Nijmegen para los Desórdenes Mitocondriales, en Noruega, el 67% de los casos de desórdenes mitocondriales se encuentran relacionados con deficiencias en enzimas aisladas, mientras que el otro 33% son casos en que se encuentra una baja en la actividad de varios complejos proteicos (Smits et al., 2010). Analizando un gran número de muestras de pacientes se han encontrado casos con deficiencias aisladas del complejo I, o el complejo IV, sin embargo para el complejo III todas las deficiencias encontradas han presentado deficiencias en otros complejos, principalmente el complejo I (Acín-Pérez et al., 2004; H Schägger, 2001). En algunos casos, como en el síndrome de Barth, la ausencia de cardiolipina produce inestabilidad en la asociación de los supercomplejos respiratorios, afectando principalmente a la biogénesis del Complejo I y su actividad de NADH deshidrogenasa (McKenzie, Lazarou, Thorburn, & Ryan, 2006).

#### *1.5 Especies Reactivas de Oxígeno*

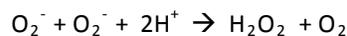
Durante el transporte de electrones, la interacción entre los transportadores de uno y dos electrones (principalmente en las oxidasas) no es 100% eficaz, por lo que a menudo se da la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Algunas

de las más importantes son: el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el cual es formado por la reducción de un electrón del  $O_2$ ; el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que se forma a partir de la reducción de dos electrones; y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), formado a partir de la reducción de tres electrones *Figura 10*. Se ha calculado que de 1 a 2% de los electrones que entran a la cadena respiratoria, no llegan a la citocromo c oxidasa, sino que los complejos I, II y III llevan a cabo reducciones de un electrón del oxígeno a superóxido (Berg et al., 2006; Mathews et al., 2002; Viola & Hool, 2010).

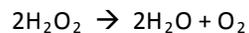


*Figura 11. Especies reactivas de oxígeno (ROS); superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.*

Las especies reactivas de oxígeno pueden provocar daños en las membranas de bicapa lipídica, durante el proceso llamado lipoperoxidación, esto puede desencadenar daño en las proteínas embebidas en la bicapa. Por ello, en las células se encuentran algunas enzimas encargadas de las defensas a la agresión oxidativa. La primera de ellas es la superóxido dismutasa (SOD) de la familia de estas enzimas; se ha descrito una SOD citosólica que contiene cobre y zinc, y otra presente en mitocondrias y bacterias, que contiene magnesio en sitio catalítico. Todas estas enzimas llevan a cabo la siguiente reacción (Mathews et al., 2002):



El peróxido de hidrógeno es metabolizado por la catalasa, hemo proteína que puede trabajar con >40,000 moléculas por segundo, debido a su elevada tasa de renovación. Esta enzima lleva a cabo la siguiente reacción:



Cabe señalar que cualquier defecto en la actividad de los complejos respiratorios puede desencadenar las llamadas miopatías mitocondriales o defectos en la cadena respiratoria, como se mencionó en el apartado anterior. Se ha reportado que estos defectos pueden causar un aumento en la producción de ROS, que al encontrarse en altas concentraciones pueden provocar estrés oxidativo, es decir, un desequilibrio entre la producción de radicales libres y las capacidad de un sistema biológico para neutralizarlos rápidamente o reparar el daño producido por los mismos (Mathews et al., 2002).

## 2. Hipótesis

Si las nanopartículas de  $TiO_2$  ingresan e inducen un aumento en la producción de ROS celular, es posible que afecten a la mitocondria; por tanto este efecto se verá reflejado en la actividad de los complejos respiratorios pero también en la formación de súper complejos respiratorios en mitocondrias de pulmón expuestas.

### 3. Objetivos

- Evaluar el efecto del dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) sobre la actividad *in vitro* de los complejos respiratorios de mitocondrias aisladas de pulmón. Evaluar la respuesta de la función mitocondrial una vez expuesta al  $\text{TiO}_2$  y ante un reto oxidante con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , después de ser expuestas al  $\text{TiO}_2$ .
  - Hacer ensayos con estas mitocondrias para exponerlas durante 30 minutos a  $0.2\mu\text{g}$  de  $\text{TiO}_2/\text{mg}$  de proteína, compararlas con mitocondrias expuestas a  $12\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 60 minutos y a mitocondrias expuestas a  $0.2\mu\text{g}$  de  $\text{TiO}_2/\text{mg}$  de proteína durante 30 minutos y a continuación a un reto oxidante con  $12\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 60 minutos.
  - Medir la actividad de los cuatro complejos respiratorios de estas mitocondrias una vez expuestas a los diferentes tratamientos de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en presencia y ausencia de SOD y Catalasa.
  - Evaluar el efecto que causa el  $\text{TiO}_2$  sobre la asociación supra molecular de los complejos respiratorios.

### 4. Metodología

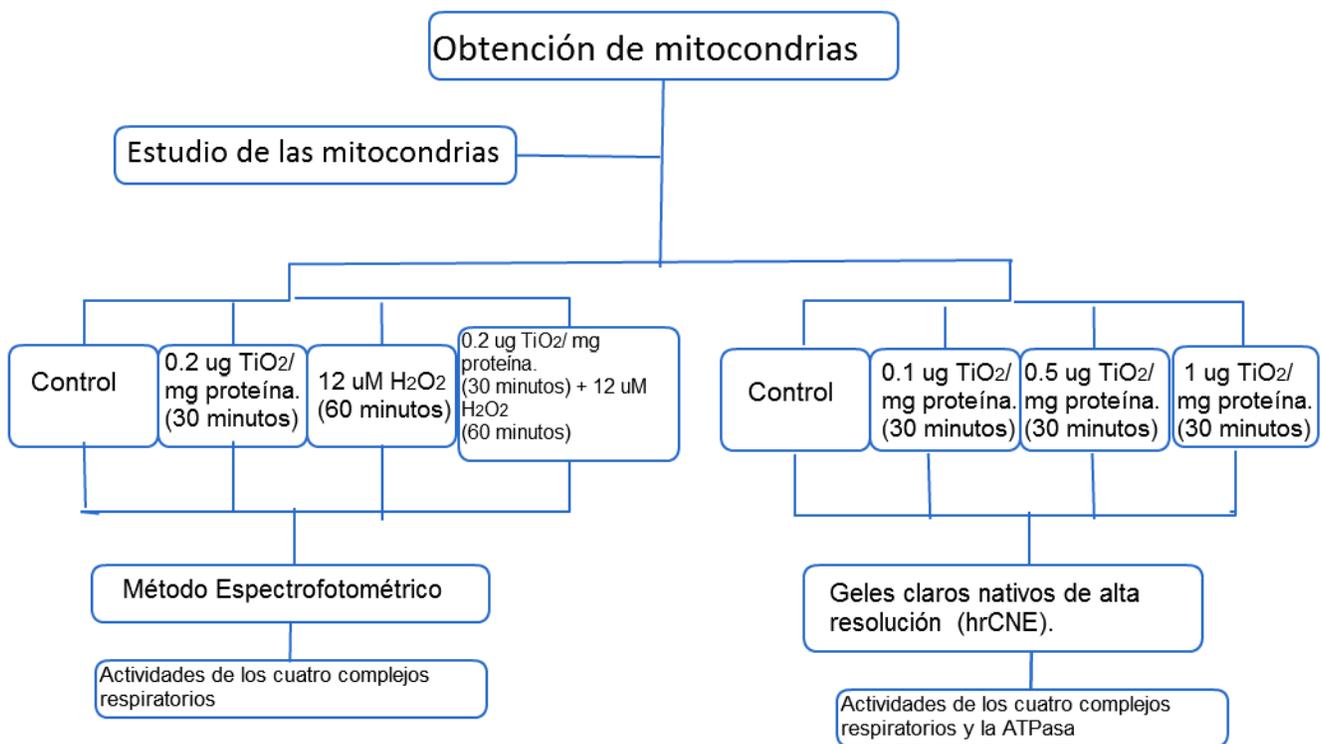


Figura 12. Diagrama de la metodología

#### 4.1 Materiales para los tratamientos

Dióxido de titanio (IV), anatasa ( $\text{TiO}_2$ ) <25nm, Sigma Aldrich catálogo #637254. Se suspendieron 10mg de  $\text{TiO}_2$  en 1ml de aguadestilada, la mezcla fue sonicada durante 30 minutos a 42,000 hz para dispersar los aglomerados de nanopartículas que se formaran, así como para homogeneizar la suspensión. Este stock fue guardado a 4°C en obscuridad y agitación constante durante su uso.

#### 4.2 Extracción de mitocondrias

Por cada extracción de mitocondrias se utilizó el tejido pulmonar y cardiaco, por separado, de diez ratas Wistar de 200 a 220g de peso, por el método de centrifugación diferencial de Chappell y Perry (1954). El tejido se diluyó al 10% (W/V) en el amortiguador (0.1M cloruro de potasio (KCl), 0.05M buffer clorhidrato tris-hidroximetilamino (Tris-Cl), pH 7.4, 0.001M ATP, 0.005M Sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) y 0.001M ácido etilediaminotetra acético (EDTA)). El tejido fue homogeneizado en un potter de vidrio y posteriormente centrifugado a 4,000 rpm (1,800 xg) durante 10 minutos en centrífuga Sorvall, rotor SS34. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm (12,000 xg) durante 10 minutos. Por último las mitocondrias fueron resuspendidas y lavadas en 10ml de medio de lavado; se centrifugaron a 8,000 rpm (7,500 xg) durante 10 minutos, y se resuspendieron en el volumen mínimo en presencia de 0.1M hidrocloreuro de fluoruro de 4-(2-aminoetil) bencenosulfonilo (AEBSF por sus siglas en inglés) para guardarlas a -20°C durante un máximo de 24 horas.

Se implementó además un lavado con KCl para remover la oxihemoglobina presente (Matsubara & Tochino, 1971), la pastilla con las mitocondrias se resuspendió y se lavó dos veces usando el medio 0.15M *tris*-KCl pH 7.4, centrifugando a 15,000 rpm (26,000 xg). Las mitocondrias aisladas se almacenaron en medio *tris*-KCl en presencia de 0.1M AEBSF a -20°C durante un máximo de 24 horas.

#### 4.3 Estudio de las mitocondrias

##### *Espectros de absorción y determinación de la concentración de citocromos de las mitocondrias*

El espectro diferencial de absorción de las mitocondrias se realizó en el espectrofotómetro Marca Aminco DW2 con modernización OLIS, utilizando el modo split. Este método consiste en que uno de los monocromadores realiza un barrido de los 400 a los 650nm de longitud de onda, haciendo incidir el haz de luz sobre la muestra y la referencia. En una celdilla de cuarzo se colocaron 0.73 mg de proteína de mitocondrias en 500 $\mu$ l de buffer de actividad (250mM sacarosa, 50mM fosfatos de K pH 7.4 0.1% Tween-20), la cual fue comparada contra aire. Se realizó un espectro de la muestra oxidada y posteriormente se añadieron unos granos de ditionita, para correr otro espectro de la muestra esta vez reducida. Utilizando la diferencia del espectro reducido con ditionita menos oxidado, se tomó la diferencia de absorción entre los picos y valles de los citocromos *a* (535 - 550nm), *b* (575 - 560nm) y *c* (600 - 620nm) en el espectro de absorción, así como sus respectivos coeficientes de extinción (citocromo  $a_{600nm}$   $\epsilon = 24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , citocromo  $b_{560nm}$   $\epsilon = 25 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , citocromo  $c_{550nm}$   $\epsilon = 17.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### *Determinación de la concentración de proteína mitocondrial*

Se tomaron 80µl de mitocondrias para hacer una cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry (1951), con la modificación de Markwell (1978) para proteínas de membrana. Se utilizó una curva patrón de albúmina (BSA) (0-20µg de proteína) por duplicado a la cual se le agregó la solución A-B, utilizando 99% de la solución A (2% cloruro de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 0.1M hidróxido de sodio (NaOH), 0.02% tartrato de sodio potasio (NaK) y 1% dodecilsulfato sódico (SDS)) y 1% de la solución B (0.4% sulfato de cobre (II) pentahidratado ( $\text{Cu}_4\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )) de acuerdo a la *Tabla 2a*. Después de incubar durante 30 min a temperatura ambiente, se colocó solución de Folin diluída 1:2. La muestra fue diluida en una relación de 1:100, de la cual se tomaron 20, 40 y 80µl por duplicado, de acuerdo con la *Tabla 2b*.

Tabla 2. Volúmenes específicos para la cuantificación de proteína por el método de Lowry modificado.

<b>a)</b>	<i>Tubo</i>	<i>Agua</i>	<i>BSA</i>	<i>Solución A+B</i>
	1	200 µl	0 µg	1 ml
	2	190 µl	10 µg	1 ml
	3	180 µl	20 µg	1 ml
	4	160 µl	40 µg	1 ml
	5	120 µl	80 µg	1 ml
	6	50 µl	150 µg	1 ml
	7	0 µl	200 µg	1 ml

<b>b)</b>	<i>Tubo</i>	<i>Agua</i>	<i>Problema</i>	<i>Solución A + B</i>
	1	180 µl	20 µg	1 ml
	2	160 µl	40 µg	1 ml
	3	120 µl	80 µg	1 ml

Se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se agregaron 100µl de 1N de reactivo de Folin, con el cual se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se hizo la lectura de las absorbancias de los todos los tubos a 750nm, utilizando los tubos 0 como blanco. Se elaboró una curva patrón graficando la concentración de proteína (µg) de los tubos 0-200 contra absorbancia, en que se interpolaron los valores de los tubos problema para determinar la concentración de proteína, tomando en cuenta la dilución.

#### *Ensayo de actividad para el complejo III mitocondrial:*

Se realizó un ensayo enzimático para cuantificar la actividad de complejo III (Bénit et al., 2006), con la finalidad de utilizarlo como referencia para la cantidad de proteína mitocondrial adecuada para los ensayos de actividad.

Las mitocondrias fueron diluidas 1:4 e incubadas en buffer de actividad (250mM sacarosa, 50mM fosfatos de K pH 7.4 0.1% Tween-20), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, en celdillas de cuarzo, se agregaron los diferentes sustratos e inhibidores junto con las mitocondrias en el orden indicado: 40µM cit c, 1mM KCN (inhibidor del complejo IV), 50µM decilbenzoquinol ( $\text{DBH}_2$ ). Para el control de reducción química (CRQ), no se añadieron mitocondrias.

Los cambios de absorbancia de la reducción del citocromo *c* se midieron usando el modo dual del espectrofotómetro Marca Aminco DW2 con modernización OLIS a las longitudes de onda de 550 y 540 nm. Para la obtención de la velocidad de reducción del citocromo *c* se utilizaron las pendientes de la adición de DBH<sub>2</sub> (a la cual se le resta la pendiente obtenida en el CRQ) y el  $\epsilon_{550-540} = 19.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . La velocidad se expresó en nmoles de citocromo *c* reducido  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (Benit, et al, 2006).

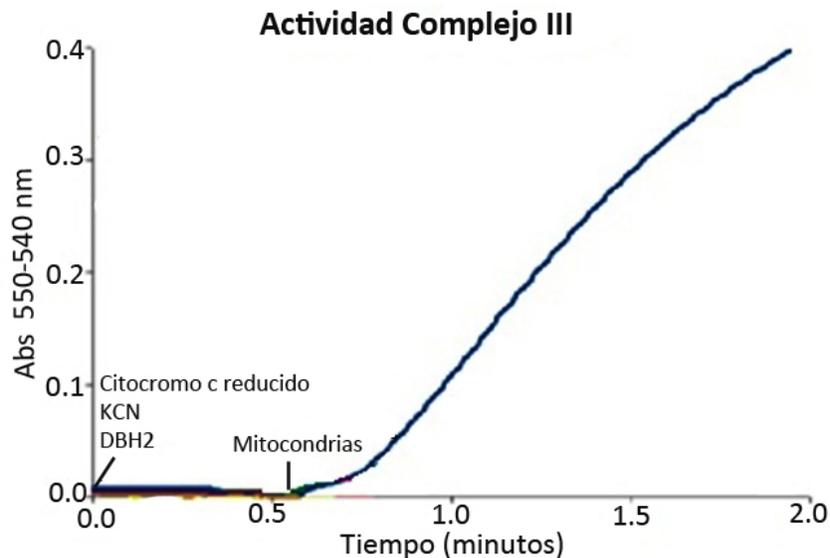


Figura 13. Trazo obtenido al medir la actividad del complejo III utilizando 0.1mg de proteína mitocondrial, 40 $\mu\text{M}$  de cit *c*, 50 $\mu\text{M}$  DBH<sub>2</sub>. Se muestra el orden en que deben agregarse los distintos sustratos e inhibidores a lo largo del tiempo para obtener un cambio en la absorbancia del citocromo *c*.

#### 4.4 Ensayo 1, Actividad de los Complejos III y IV

Las mitocondrias fueron diluidas 1:4 e incubadas a temperatura ambiente en buffer de actividad (250mM sacarosa, 50mM fosfatos de K pH 7.4 0.1% Tween-20), donde se agregaron los diferentes tratamientos: 0.2 $\mu\text{g}$  TiO<sub>2</sub>/mg de proteína durante 30min, 12 $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 60min y 0.2 $\mu\text{g}$  TiO<sub>2</sub>/mg de proteína durante 30min seguido de a 12 $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 60 min.

En la celdilla de cuarzo del espectrofotómetro se colocó amortiguador de actividad y se agregaron los diferentes sustratos e inhibidores junto con las mitocondrias en el siguiente orden: 10 $\mu\text{M}$  cit *c* reducido, 8 $\mu\text{M}$  Rotenona, 0.1mg de proteína mitocondrial, 1mM KCN, 5mM Succinato, 30 $\mu\text{M}$  cit *c* oxidado, 2mM TTFA, 333mM EDTA, 50 $\mu\text{M}$  DBH<sub>2</sub>, 1 $\mu\text{M}$  Antimicina. Los cambios de absorbancia se midieron a las longitudes de onda 550 y 540 nm, usando el modo dual del espectrofotómetro marca Aminco DW2 con modernización OLIS, siguiendo la reducción (u oxidación) del citocromo *c*. Para la obtención de la velocidad de reducción (u oxidación) del citocromo *c* se obtuvieron las pendientes de cada adición del trazo de absorbancia contra tiempo y se utilizó el coeficiente de extinción específico de:  $\epsilon_{550-540} = 19.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Benit, et al, 2006). La velocidad de actividad se expresó en nmoles de citocromo *c* oxidado (ó reducido)  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$

## Ensayo actividades complejos III y IV

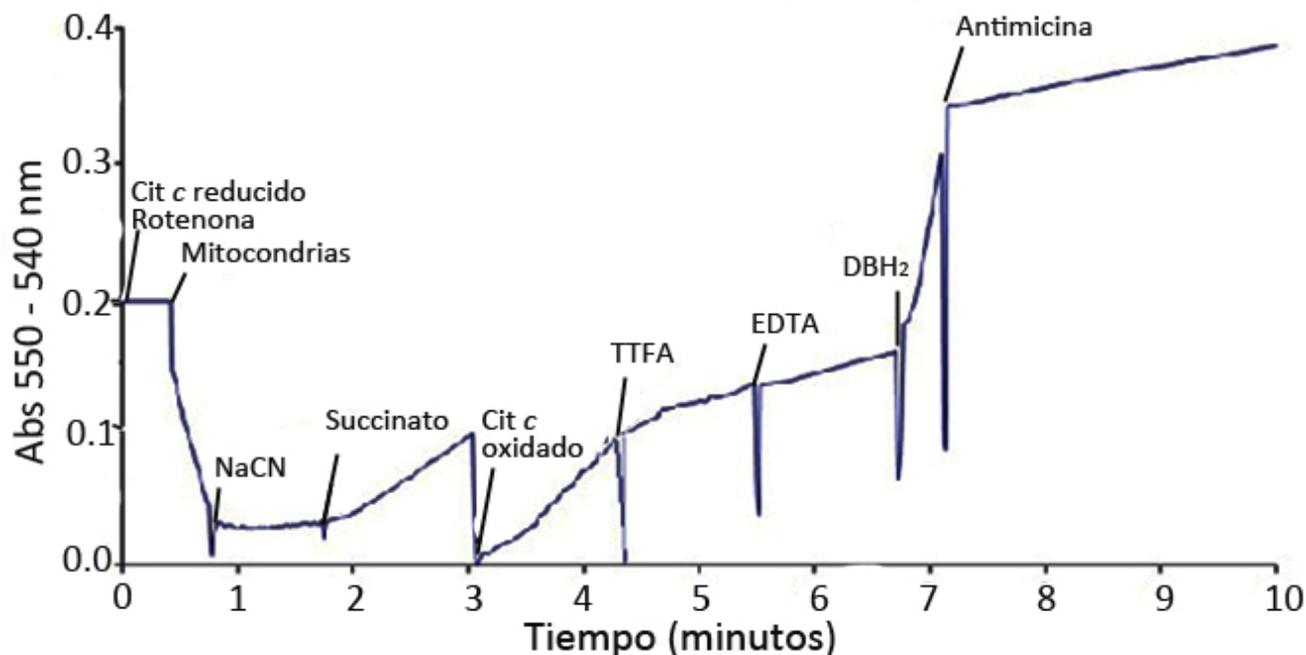


Figura 14. Trazo obtenido al medir la actividad de los complejos III y IV. Se muestra el orden en que deben agregarse los distintos sustratos e inhibidores a lo largo del tiempo para obtener un cambio en la absorbencia del citocromo c.

### 4.5 Ensayo 2, Actividad de los Complejos I y II

Las mitocondrias fueron diluidas 1:4 e incubadas a 4°C en buffer de actividad con azida de Na (250mM sacarosa, 50mM fosfatos de K pH7.4 0.1% Tween-20, 1mM NaN<sub>3</sub>), donde se agregaron los diferentes tratamientos; 0.2µg TiO<sub>2</sub>/mg de proteína durante 30min, 12µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 60min o 0.2µg TiO<sub>2</sub>/mg de proteína durante 30min seguido de 12µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 60 min.

En celdillas de cuarzo con buffer de actividad con azida de Na se agregaron los diferentes sustratos e inhibidores junto con las mitocondrias en el siguiente orden: 10µM NaCN, 0.1mg de proteína mitocondrial, 5mM DCPIP, 1mM NADH, 5mM Rotenona, 5mM 2,6-Diclorofenolindofenol (DCPIP), 30µM Succinato, 2mM PMS, 2mM TTFa, 50µM DCPIP, 1µM DQ. Los cambios de absorbancia se midieron a las longitudes de onda de 600 y 750 nm en el modo dual del espectrofotómetro marca Aminco DW2 con modernización OLIS, siguiendo la reducción (u oxidación) del DCPIP. Para la obtención de la velocidad de reducción (u oxidación) del DCPIP expresada en nmoles de DCPIP reducido (u oxidado) min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> se obtuvieron las pendientes de cada adición del trazo de absorbancia contra tiempo y se utilizó el coeficiente de extinción para el DCPIP de  $\epsilon_{550-540} = 22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Bénit et al., 2006).

## Ensayos actividades complejos I y II

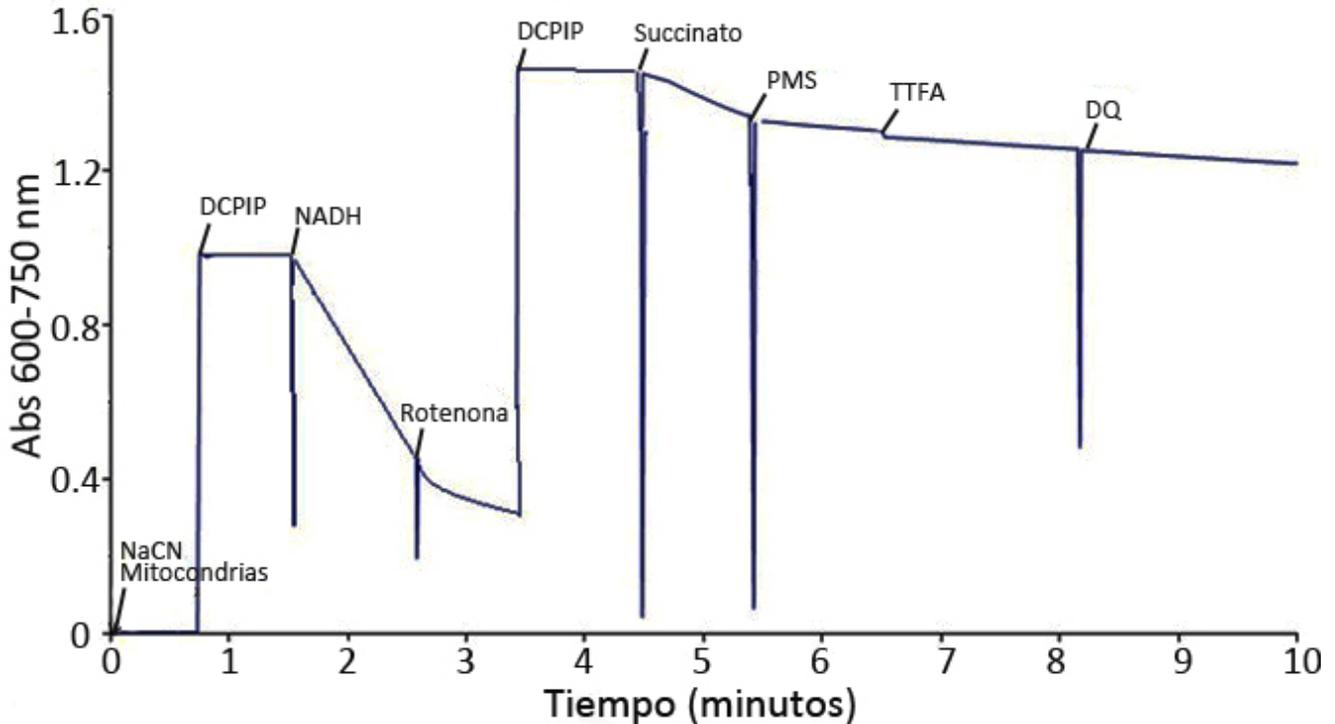


Figura 15. Trazo obtenido al medir la actividad de los complejos I y II. Se muestra el orden en que deben agregarse los distintos sustratos e inhibidores a lo largo del tiempo para obtener un cambio en la absorbencia del DCPIP.

### 4.6 Análisis Estadístico

Como medida de tendencia central se obtuvo la media o promedio, como medidas de variabilidad se utilizaron la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV). El CV es una medida representada en porcentaje que indica si la variación de los datos es grande o pequeña, considerándose un valor de 10% o menor adecuado (Durán et al., 2008). Cada uno de los datos se presentan normalizados como porcentaje de actividad con respecto a la actividad de su respectivo control, con la finalidad de eliminar el error de muestreo, siendo el error presente en las gráficas causado por los distintos tratamientos. Por último se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores en el programa estadístico IMB SPSS Statistics 17.0.

### 4.7 Solubilización de mitocondrias para los geles nativos:

Se utilizó una solución de mitocondrias con una concentración de proteínas de 10mg/ml, las cuales fueron expuestas a los distintos tratamientos de 0.1µg TiO<sub>2</sub>/mg de proteína, 0.5µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína y 1µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína durante 30 minutos a 4°C. Estas mitocondrias fueron solubilizadas con 1.5mg de Dodecil maltósido (DDM)/ mg proteína y 0.1M de AEBSEF en buffer de muestra para geles hrCNE (50mM NaCl, 50mM imidazol, 2mM ácido aminocaproico, 1mM EDTA, pH 7.0), en que se incubó en agitación durante 30 minutos a 4°C. Se centrifugó en la ultracentrífuga Sorvall Ultra 80, rotor T-875 a 40,000 rpm (80,000 xg) durante 10 minutos. Posteriormente se recuperó el sobrenadante, al que se agregó 0.01% de Rojo de

Ponceau S, y 20µl de 50% Glicerol por cada 150µl de solubilizado, para los geles claros nativos de alta resolución (hrCNE) (Wittig et al., 2007b).

#### 4.8 Geles hrCNE

Se prepararon geles de placa con las dimensiones: 16cm x 16cm x 1.5mm de grosor (en el sistema de electroforesis C.B.S Scientific Company, Adjustable Slab Gel 16.5cm wide) con un gradiente del 4% al 13% de poliacrilamida, como se muestra en la *Tabla 3*. Para determinar la cantidad adecuada de proteína a cargar en el gel, se corrió primeramente un gel hrCNE con mitocondrias aisladas de corazón como referencia ya que es uno de los tejidos ampliamente estudiados por este método. Se cargaron cantidades crecientes de proteína; 100 µg, 200µg, 400µg, 800µg, 1000µg y 1500µg. La electroforesis se corrió con un buffer superior (50mM tricina, 15mM Bis-Tris, 0.02% DDM, 0.05% DOC, pH 7.0) y un Buffer Inferior (15mM Bis-Tris, pH 7.0), a 4°C, 100V, 20mA, 250W durante 90 minutos, a partir de ahí, las condiciones de corrida se modificaron a 500V durante 3horas. Los geles se digitalizaron con el escáner hp 3670, y posteriormente se guardaron a 4°C para su uso posterior (Wittig et al., 2007b).

Tabla 3. Buffers y su volumen para hacer geles hrCNE con gradiente del 4 al 13%.

	Gel Condensador 4%	Gel Separador 4%	Gel Separador 13%
<b>Acrilamida 48.5%</b>	0.72 ml	1.5 ml	3.9 ml
<b>Bisacrilamida 1.5%</b>			
<b>Buffer de gel 3x</b>	3.33 ml	6 ml	5 ml
<b>Glicerol 79.5%</b>	0 ml	0 ml	3.75 ml
<b>Agua</b>	5.94 ml	10.4 ml	3 ml
<b>TEMED</b>	6.6 µl	5 µl	5 µl
<b>Persulfato de amonio 10%</b>	53.3 µl	50 µl	50 µl
<b>Volumen total</b>	<b>8 ml</b>	<b>18 ml</b>	<b>14 ml</b>

Se hicieron electroforesis con las mitocondrias extraídas de pulmón, con cantidades crecientes de proteína; 100 µg, 200µg, 400µg y 800µg de proteína, con la finalidad de determinar aquella cantidad de proteína que permitiera utilizar la menor cantidad de muestra y obtener bandas mejor definidas. Se corrieron en las mismas condiciones (Wittig et al., 2007a). Una vez establecidas las condiciones de carga de los geles, se realizaron los geles hrCNE y se reveló la presencia de los cinco complejos por medio de la técnica de actividad en gel. Se solubilizaron mitocondrias de pulmón luego de ser expuestas a los tres diferentes tratamientos: 0.1µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína; 0.5 µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína; 1 µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína durante 30 minutos. Utilizando las condiciones establecidas se corrieron los geles hrCNE.

#### 4.9 Tinción con Coomassie

El gel fue teñido con una mezcla de 0.2% coomassie, 50% metanol y 7% ácido acético en agua durante 1 hora en agitación constante. Para desteñir, el gel se sumergió durante media hora en una solución con 50% metanol en agua y el tiempo necesario hasta que se observaran las bandas de proteína con una solución de 25% etanol 96° y 7% ácido acético en agua. Para su preservación se guardaron en bolsas de plástico con 7% ácido acético a 4°C.

#### 4.10 *Ensayos de Actividad en geles nativos, complejo I y II*

Una vez terminada la electroforesis, se cortaron bandas del gel correspondiendo a cada carril y se incubaron en el buffer para la actividad de la NADH-deshidrogenasa (2.5 mg/ml NTB (azul de nitrotetrasolio), 10 mg/ml NADH, 10ml 5mM Tris/HCl, pH 7.4) durante 3 a 5 minutos, una vez escaneado, fue incubado en el buffer para la actividad en gel de la Succinato-deshidrogenasa (200µl de 1M Succinato de sodio pH 7.0, 8µl de 250mM PMS en DMSO, 2.5 mg/ml NTB, 10ml de 5mM Tris, pH 7.4) durante 30 minutos (Zerbetto et al., 1997, Wittig et al., 2007b). El gel se escaneó nuevamente una vez que se observaron bandas de actividad del complejo II.

#### 4.11 *Ensayo de Actividad en geles nativos, complejo III y IV*

El gel fue incubado en el buffer de actividad del complejo III (5mg Diaminobenzidina, 10ml de Buffer 50mM de fosfatos de sodio, pH 7.2) durante 60 minutos hasta que se observaron bandas de actividad. Una vez escaneado, fue incubado nuevamente, pero esta vez en el buffer de actividad del complejo IV (5mg Diaminobenzidina, 100µl de 5mM Citocromo c de caballo, 10ml de 50mM Buffer fosfatos de sodio, pH 7.2) durante 30 minutos (Zerbetto et al., 1997, Wittig et al., 2007b), siendo escaneado posteriormente.

#### 4.12 *Ensayo de Actividad en geles nativos, ATPasa*

Para la actividad de la ATPasa, el gel fue incubado durante 2 horas en medio de ATPasa (35mM Tris, 270mM Glicina), y posteriormente fue transferido al medio de actividad de la ATPasa (35mM Tris, 270mM Glicina, 14mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2% Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 8mM ATP, pH 8.3) durante toda la noche (Zerbetto et al., 1997, Wittig et al., 2007b). Posteriormente fue escaneado.

#### 4.13 *Geles de 2D (SDS-PAGE)*

Conociendo la ubicación de los complejos respiratorios en el gel hrCNE por su actividad en gel, se realizó un gel 2D en condiciones desnaturizantes para comprobar la composición proteica de los supercomplejos. Posteriormente se calculó su peso molecular aparente, los resultados de las actividades en gel y el análisis en 2D para calcular la composición estequiométrica de las bandas del gel hrCNE de mitocondrias extraídas de corazón, mitocondrias extraídas de pulmón, y mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 minutos.

Se incubaron las tiras de gel de hrCNE en solución 2D (2.5% SDS, 10% Glicerol, 0.0625M Tris, 10mM Ditiotreitól (DTT), no es necesario ajustar el pH) durante 30 minutos en agitación constante. Posteriormente se colocaron sobre una de las placas de dimensiones: 16cm x 16cm x 1.5mm de grosor, a la altura del gel condensador durante 30 minutos. Posteriormente se preparó un gel 14% de poliacrilamida para el gel separador y 4% para el gel concentrador, *Tabla 4*.

La electroforesis se realizó con las siguientes condiciones: en el mismo gel se corrieron las muestras de proteína junto a una solución de marcadores de peso molecular preteñidos marca NIPPON genetics. Las condiciones de corrida durante las primeras 3 horas fueron de 45V, incrementando a 120V durante las siguientes 15 horas de corrida (Hermann Schägger, 2006).

Tabla 4. Buffers y su volumen para hacer geles 2D con 14% de poliacrilamida.

	Gel Condensador 4%	Gel Separador 14%
<b>Acrilamida 30%</b>	<b>1.6 ml</b>	<b>28 ml</b>
<b>Bisacrilamida 0.938%</b>		
<b>Tris 3M – HCl 1M – SDS 0.3%</b>	<b>3 ml</b>	<b>20 ml</b>
<b>Glicerol 79.5%</b>	<b>0 ml</b>	<b>8 ml</b>
<b>Agua</b>	<b>7.4 ml</b>	<b>4 ml</b>
<b>TEMED</b>	<b>8 µl</b>	<b>20 µl</b>
<b>Persulfato de amonio 10%</b>	<b>80 µl</b>	<b>200 µl</b>
<b>Volumen total</b>	<b>1 ml</b>	<b>61 ml</b>

#### 4.14 Tinción con Plata

Los geles se incubaron con solución fijadora (50% Metanol, 5% Ácido acético) durante 20 minutos. A continuación, fueron lavados 3 veces con agua destilada calidad MiliQ durante 20 minutos; posteriormente se incubaron en solución sensibilizadora (0.02% Tiosulfato de Sodio) durante 2 minutos. Finalmente, se lavaron con agua dos veces durante un minuto (Hermann Schägger, 2006).

Los geles fueron incubados durante 1 hora a 4°C en agitación constante en solución de nitrato de plata (0.1% nitrato de plata), luego de lavar dos veces con agua, se añadió solución reveladora (2% Carbonato de sodio y 0.04% formol) y se paró la reacción con la solución de 5% Ácido acético. Para su conservación, los geles fueron guardados a 4°C en bolsas de plástico en 1% de ácido acético (Schagger, 2006).

#### 4.15 Análisis de los geles.

Las imágenes digitalizadas de los geles se analizaron con el software BioSens Gel Imagine System para obtener los análisis densitométricos que ayudan a diferenciar las distintas bandas. Por otro lado fueron ingresadas y analizadas con el software Image Gauge V4.0 de Fujifilm para obtener los pesos moleculares de las distintas bandas.

## 5. Resultados

### 5.1 Obtención de las mitocondrias

Por cada extracción, se utilizaron 10 pares de pulmones de rata, con un peso aproximado de 0.5g cada uno, realizando un total de 5 extracciones, obteniendo un promedio de 6.34 (+/- 1.66) mg de proteína con una concentración promedio de

4.23 (+/- 1.11) mg/ml. Para la extracción de mitocondrias de corazón se utilizaron 10 corazones de un peso aproximado de 1g cada uno. Se realizaron un total de 4 extracciones de mitocondrias, obteniendo un promedio de 8.94 (+/- 2.44) mg de proteína en una concentración promedio de 4.49 (+/- 1.22) mg/ml.

### 5.2 Estudio de las mitocondrias

Siendo las mitocondrias de corazón algunas de las más utilizadas en la literatura debido a la alta proporción de proteína respecto a los lípidos mitocondriales, se decidió compararlas con las de pulmón debido a los pocos registros sobre la extracción de mitocondrias de este tejido. A estas mitocondrias se les cuantificó la concentración de citocromos *a*, *b* y *c* por medio de espectros de absorción. En la *Figura 15* se muestran sus espectros diferenciales de absorción (reducido con ditionita – oxidado).

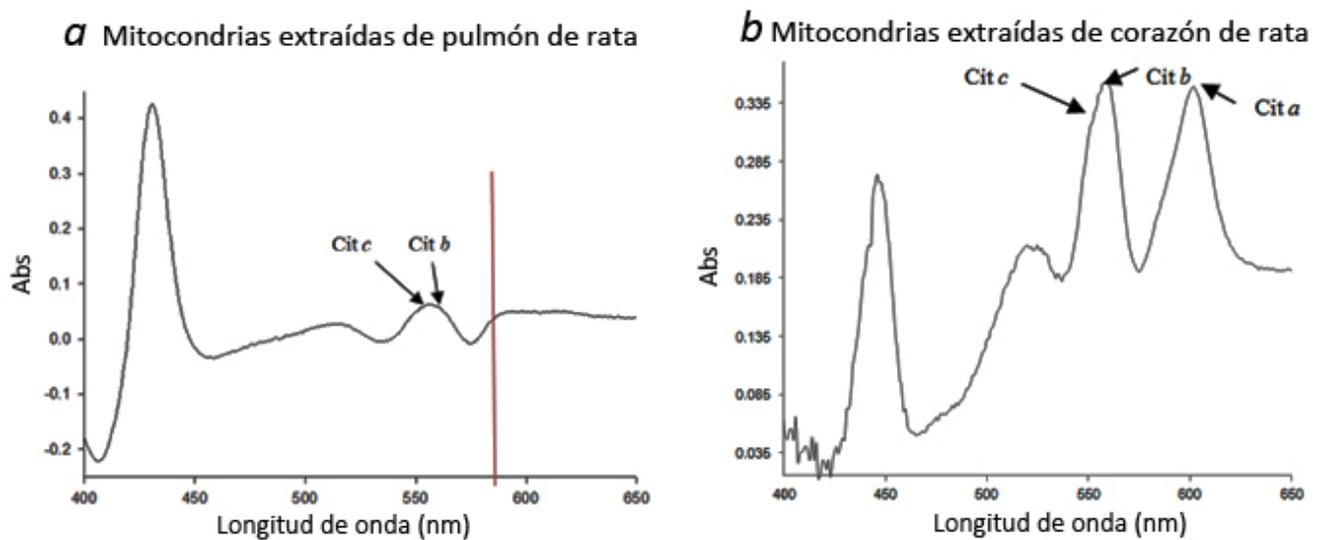


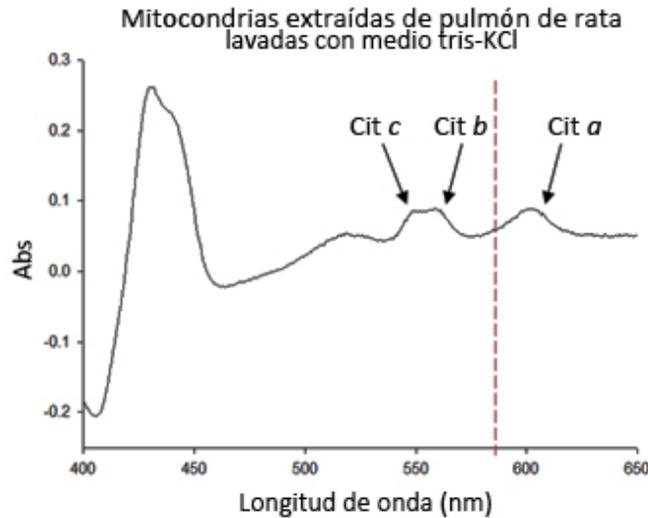
Figura 16. Espectro diferencial de absorción (reducido con ditionita – oxidado) de mitocondrias aisladas de (a) pulmón y (b) corazón por el método de Chappell y Perry. Se muestra la ubicación de los picos  $\alpha$  de absorción de los citocromos *a*, *b* y *c*. Se señala con la línea la distorsión en el espectro, creada por la presencia de oxihemoglobina en las mitocondrias extraídas de pulmón de rata.

Las mitocondrias de pulmón presentaron una anomalía en la región del pico alfa de la citocromo c oxidasa, esta anomalía se atribuyó a la presencia de oxihemoglobina, cuyo pico de absorción se encuentra cercano a 750nm (en el espectro oxidado). Este pico de absorción causa una distorsión en el espectro diferencial de absorción dificultando la cuantificación del citocromo *a*. Para retirar esta oxihemoglobina, se implementó un lavado de las mitocondrias con medio tris-KCl

(Matsubara and Tochino, 1971). Se realizaron un total de 7 extracciones bajo estas condiciones, obteniendo un promedio de 11.01 (+/- 3.45) mg de proteína en una concentración promedio de 14.69 (+/- 4.6) mg/ml. En la *Figura 16* se muestra el espectro diferencial (reducido con ditionita – oxidado) de las mismas mitocondrias, luego del lavado con medio tris-KCl. En tales condiciones fue posible la cuantificación de los citocromos *a*, *b* y *c*, *tabla 5*.

Tabla 5. Concentración de citocromos *a*, *b* y *c*

Mitocondrias extraídas de pulmón	Mitocondrias extraídas de corazón
295 nmoles cit <i>c</i> /mg proteína	711 nmoles cit <i>c</i> /mg proteína
381 nmoles cit <i>b</i> /mg proteína	480 nmoles cit <i>b</i> /mg proteína
52.4 nmoles cit <i>a</i> /mg proteína	462 nmoles cit <i>a</i> /mg proteína



*Figura 17. Espectro diferencial de absorción (reducido con ditionita – oxidado) de las mitocondrias aisladas de pulmón por el método de Chappell y Perry con el posterior lavado con medio tris-KCl (Matsubara and Tochino 1971). Se muestra la ubicación de los picos  $\alpha$  de absorción de los citocromos *a*, *b*, y *c*. Se señala con la línea punteada, dónde se encontraba la distorsión en el espectro de absorción creada por la presencia de oxihemoglobina.*

Una vez obtenidas las mitocondrias en condiciones óptimas, se midió la actividad del complejo III con diferentes cantidades de proteína. Estas actividades fueron utilizadas como un parámetro para determinar la cantidad de proteína a utilizar en los ensayos de actividad. En la *Figura 17*, se muestran los trazos de actividad de reducción del citocromo *c* de caballo en presencia de cantidades crecientes de mitocondrias de pulmón. Se observó que al duplicar o triplicar la cantidad de proteína en el ensayo *Figura 17a* no hay un aumento en la actividad específica (expresada en nmoles cit *c* reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) *Figura 17b*, por lo que se decidió utilizar 0.1 mg de proteína para las actividades de los complejos por el método espectrofotométrico.

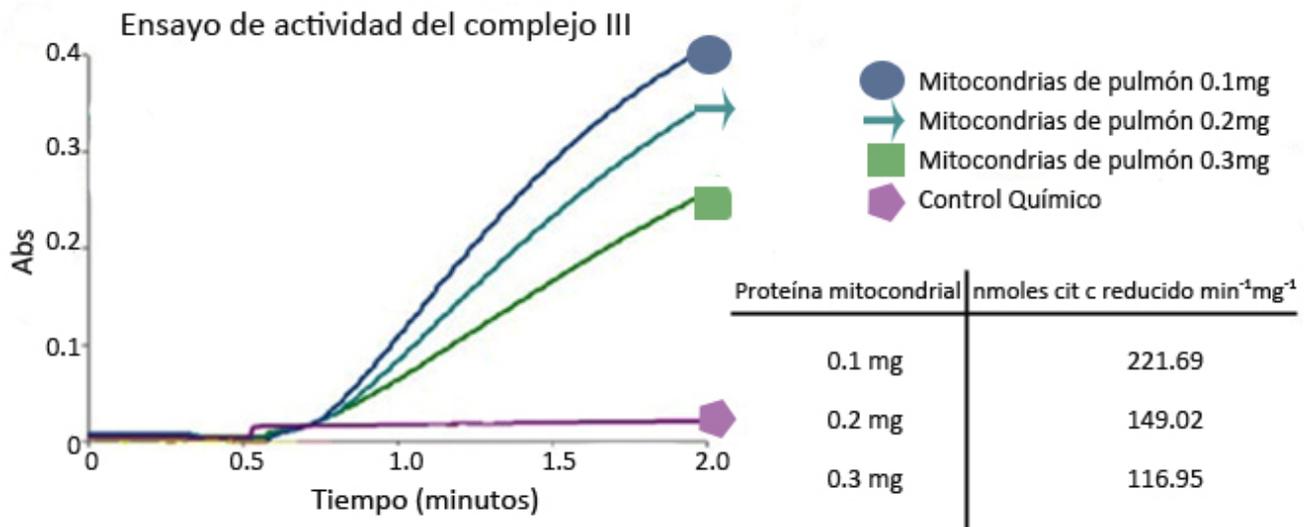


Figura 18. a) Ensayo de Actividad del complejo III con diferentes cantidades de mitocondrias extraídas de pulmón de rata, siguiendo la reducción del citocromo c de caballo a 550 – 540nm (◆ Control de reducción química; ■ 0.1mg proteína mitocondrial; → 0.2mg proteína mitocondrial; ● 0.3 mg proteína mitocondrial), b) Tabla con los valores de actividad para 0.1, 0.2 y 0.3 mg de proteína por ensayo expresados en nmol cit c reducido min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>.

### 5.3 Actividad de los cuatro complejos respiratorios.

#### 5.3.1 Actividad de los complejos I y II

Siguiendo la reducción del DCPIP a 600-750nm, se obtuvo la actividad del complejo I o NADH deshidrogenasa y el complejo II o Succinato deshidrogenasa (en nmol de DCPIP reducido min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) para aquellas mitocondrias control, así como para las expuestas a los tratamientos de 0.2µg TiO<sub>2</sub>/mg de proteína durante 30min, 12µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 60min y 0.2µg TiO<sub>2</sub>/mg de proteína durante 30min seguido de a 12µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 60 min.

Las mitocondrias sin tratamiento presentaron una actividad de NADH deshidrogenasa promedio de 180.3 nmol DCPIP reducido min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> (con una desviación estándar de 85.2 unidades [n=3]). Los datos de las actividades fueron normalizados, expresándose en porcentaje de actividad con respecto a las mitocondrias control para cada tratamiento, para de esta manera evitar el error de muestreo. *Figura 18* las mitocondrias tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentan una gran variabilidad (CV= 38%) en la actividad de NADH deshidrogenasa, sin embargo no hay cambios o variabilidad significativa para los tratamientos con TiO<sub>2</sub> y TiO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

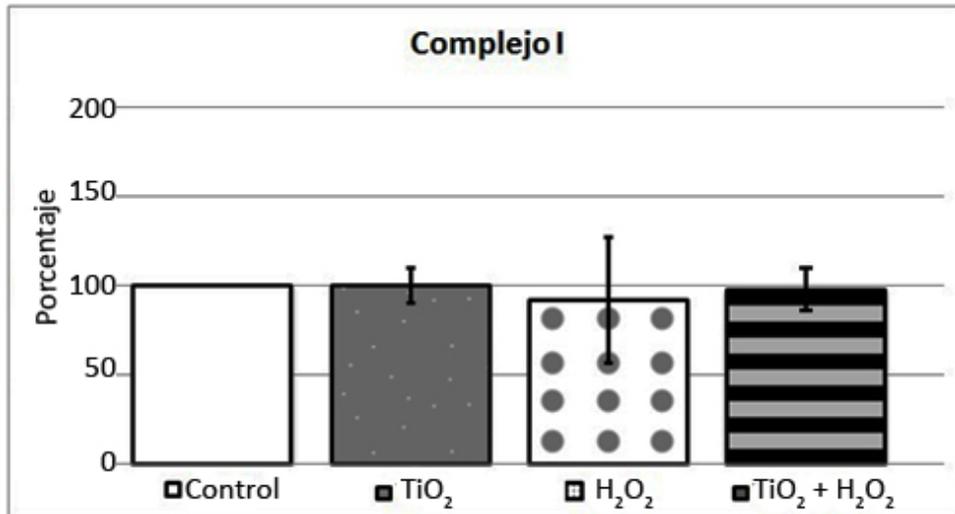


Figura 19. Actividad de NADH deshidrogenasa (complejo I) de mitocondrias extraídas de pulmón de rata luego de sus distintos tratamientos con 0.2µg TiO<sub>2</sub>/mg de proteína durante 30min (CV = 9%), 12µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 60min (CV = 38%) y 0.2µg TiO<sub>2</sub>/mg de proteína durante 30min seguido de a 12µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 60 min (CV = 12%). Datos normalizados con respecto a la actividad del control (n=3).

Las mitocondrias sin tratamiento presentaron una actividad de Succinato deshidrogenasa promedio de 12.17 nmol DCPIP reducido min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> (con una desviación estándar de 5.85 unidades [n=3]). Los datos de las actividades fueron normalizados, expresándose en porcentaje de actividad con respecto a las mitocondrias control para cada tratamiento como se muestra en la Figura 19. Las mitocondrias tratadas con TiO<sub>2</sub> presentan la menor variabilidad (CV= 25%) en la actividad de Succinato deshidrogenasa, sin embargo hay cambios o variabilidad significativa para los tratamientos con y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CV= 60%) y TiO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CV= 75%).

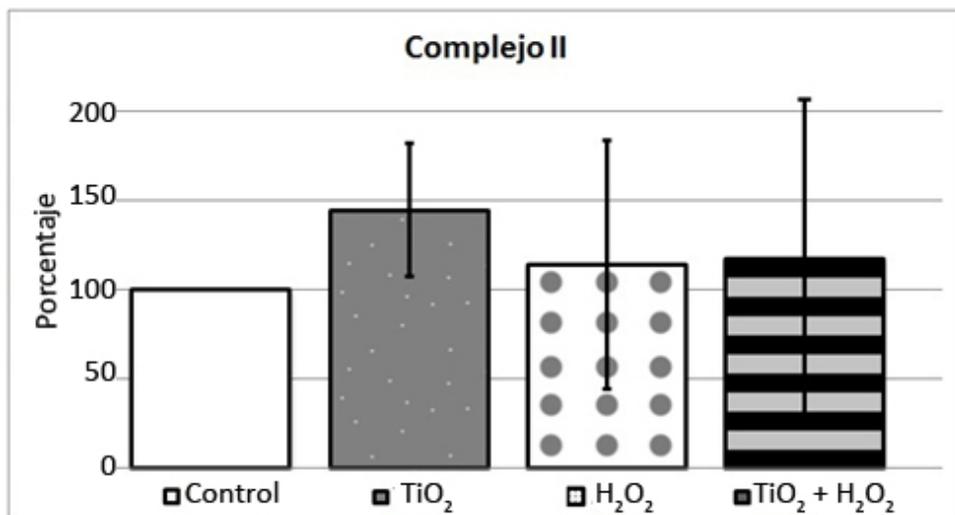
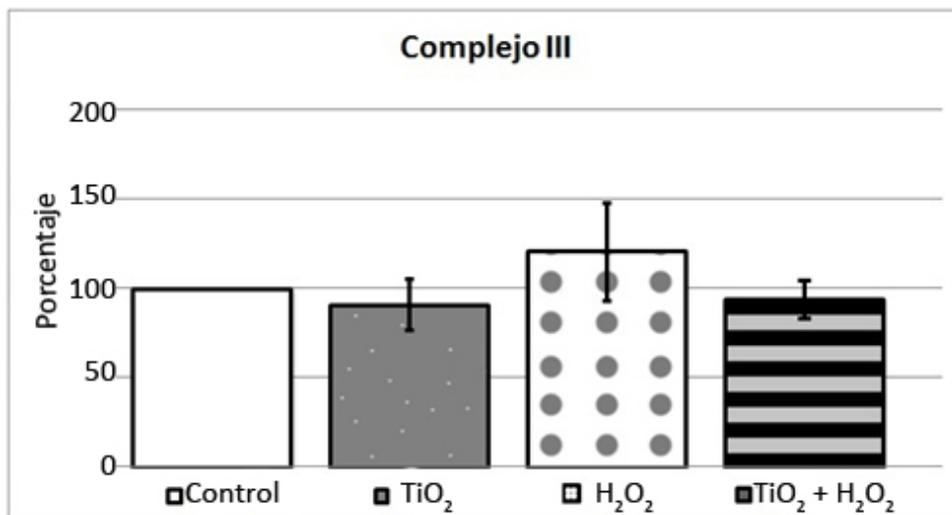


Figura 20. Actividad de Succinato deshidrogenasa (complejo II) de mitocondrias extraídas de pulmón de rata luego de sus distintos tratamientos con 0.2µg TiO<sub>2</sub>/mg de proteína durante 30min (CV = 25%), 12µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 60min (CV = 60%) y 0.2µg TiO<sub>2</sub>/mg de proteína durante 30min seguido de a 12µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 60 min (CV = 75%). Datos normalizados con respecto a la actividad del control (n=3).

### 5.3.2 Actividad de los complejos III y IV

Siguiendo la oxidación y reducción del citocromo *c* de caballo a 550 - 540 nm, se obtuvo la actividad del complejo III o ubiquinol citocromo *c* oxidoreductasa (en nmol de cit *c* reducido  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) y el complejo IV o citocromo *c* oxidasa (en nmol de cit *c* oxidado  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) para las mitocondrias control, así como para las expuestas a los tratamientos de  $0.2\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  de proteína durante 30min,  $12\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  durante 60min y  $0.2\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  de proteína durante 30min seguido de a  $12\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  durante 60 min.

Las mitocondrias sin tratamiento presentaron una actividad de ubiquinol citocromo *c* oxidoreductasa promedio de 145.3 nmol cit *c* reducido  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (con una desviación estándar de 54.75 unidades [n=3]). Los datos de las actividades fueron normalizados, expresándose en porcentaje de actividad con respecto a las mitocondrias control para cada tratamiento como se muestra en la *Figura 20*. Las mitocondrias tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  presentan una gran variabilidad (CV= 22%) en la actividad de NADH deshidrogenasa, sin embargo no hay cambios o variabilidad significativa para los tratamientos con  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ .



*Figura 21. Actividad de ubiquinol citocromo c oxidoreductasa (complejo III) de mitocondrias extraídas de pulmón de rata luego de sus distintos tratamientos con  $0.2\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  de proteína durante 30min (CV = 15%),  $12\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  durante 60min (CV = 22%) y  $0.2\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  de proteína durante 30min seguido de a  $12\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  durante 60 min (CV = 11%). Datos normalizados con respecto a la actividad del control (n=3).*

Las mitocondrias sin tratamiento presentaron una actividad de citocromo *c* oxidasa promedio de 243.3 nmol cit *c* oxidado  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (con una desviación estándar de 54.5 unidades [n=3]). Los datos de las actividades fueron normalizados, expresándose en porcentaje de actividad con respecto a las mitocondrias control para cada tratamiento como se muestra en la *Figura 21*. Las mitocondrias con los distintos tratamientos,  $\text{TiO}_2$  (CV= 86%),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (CV= 77%) y  $\text{TiO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$  (CV= 73%) presentaron una alta variabilidad.

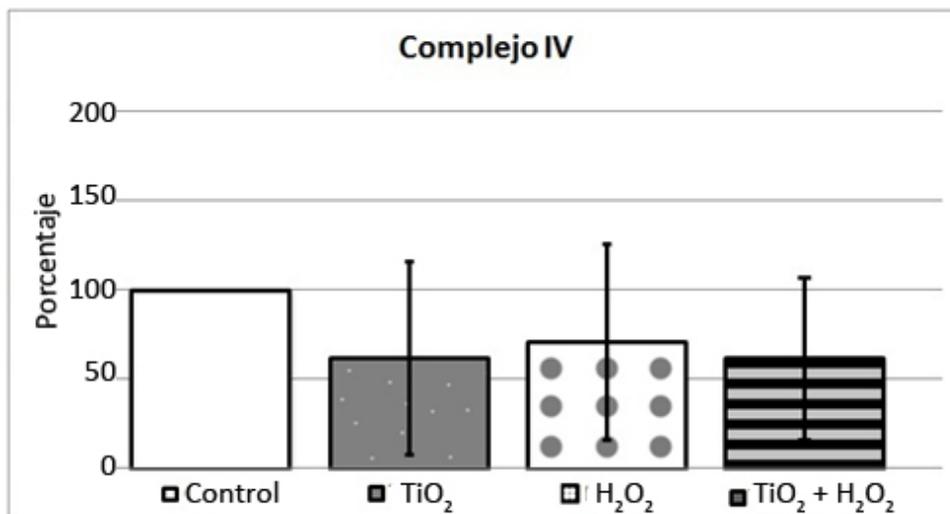


Figura 22. Actividad de citocromo c oxidasa (complejo IV) de mitocondrias extraidas de pulmón de rata luego de sus distintos tratamientos con  $0.2\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  de proteína durante 30min (CV = 86%),  $12\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  durante 60min (CV = 77%) y  $0.2\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  de proteína durante 30min seguido de a  $12\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  durante 60 min (CV = 73%). Datos normalizados con respecto a la actividad del control (n=3).

#### 5.4 Actividad de los cuatro complejos respiratorios en presencia de SOD y Catalasa.

##### 5.4.1 Actividad de los complejos I y II en presencia de SOD y Catalasa

Los complejos respiratorios son una de las principales fuentes de especies reactivas de oxígeno dentro de la mitocondria, su producción aumenta conforme a la edad o el daño provocado a los complejos respiratorios. Es necesario mencionar que el ensayo utilizado tanto el citocromo c de caballo como el DCPIP son moléculas sensibles a los radicales libres, que se presentan como parte de la actividad de los complejos respiratorios. Así, atribuimos parte de la dispersión presente en las actividades de los complejos respiratorios a la presencia de estas especies. Por lo cual, se decidió repetir las actividades de los complejos respiratorios, esta vez en presencia de enzimas purificadas de SOD de bovino (50 U/ml), SOD de *E. Coli* (50 U/ml) y Catalasa (50 U/ml) con la finalidad de eliminar a las dos principales especies reactivas de oxígeno.

Las mitocondrias sin tratamiento presentaron una actividad de NADH deshidrogenasa promedio de  $220.87 \text{ nmol DCPIP reducido min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (con una desviación estándar de 92 unidades [n=3]), mientras que en presencia de SOD y Catalasa, presentaron una actividad promedio de  $246.67 \text{ nmol DCPIP reducido min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (con una desviación estándar de 86.62 unidades [n=3]). Los datos de las actividades fueron normalizados, expresándose en porcentaje de actividad con respecto a las mitocondrias control en presencia de SOD y Catalasa para cada tratamiento, como se muestra en la Figura 22. Las mitocondrias con los distintos tratamientos, TiO<sub>2</sub> (CV= 11%), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CV= 13%) y TiO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CV= 12%) presentaron una variabilidad baja en presencia de SOD y Catalasa.

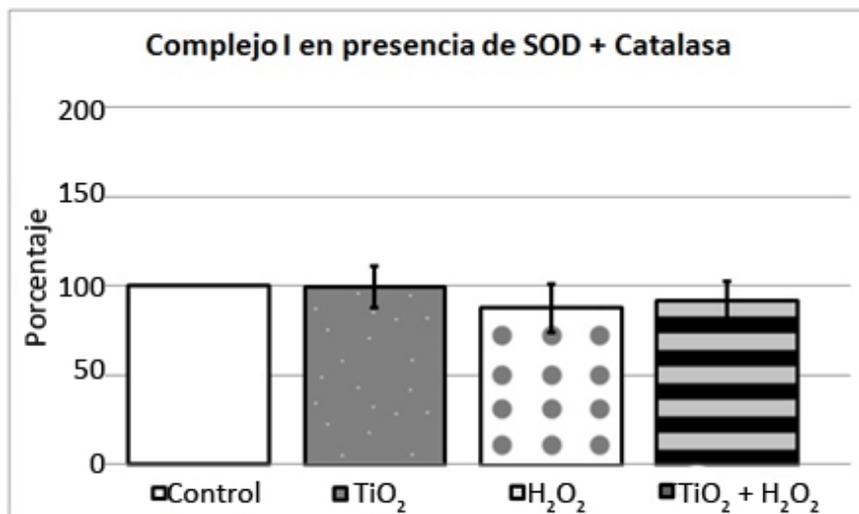


Figura 23. Actividad de NADH deshidrogenasa (complejo I) de mitocondrias extraídas de pulmón de rata en presencia de SOD y Catalasa luego de sus distintos tratamientos con  $0.2\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  de proteína durante 30min (CV = 11%),  $12\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  durante 60min (CV = 15%) y  $0.2\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  de proteína durante 30min seguido de a  $12\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  durante 60 min (CV = 12%). Datos normalizados con respecto a la actividad del control (n=3).

Las mitocondrias sin tratamiento presentaron una actividad de Succinato deshidrogenasa promedio de  $17.87 \text{ nmol DCPIP reducido min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (con una desviación estándar de 14.06 unidades [n=3]), mientras que en presencia de SOD y Catalasa presentaron una actividad promedio de  $13.54 \text{ nmol DCPIP reducido min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (con una desviación estándar de 3.5 unidades [n=3]). Los datos de las actividades fueron normalizados, expresándose en porcentaje de actividad con respecto a las mitocondrias control en presencia de SOD y Catalasa para cada tratamiento como se muestra en la Figura 23. Las mitocondrias tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  presentaron la menor variabilidad (CV= 19%) en la actividad de Succinato deshidrogenasa, sin embargo hay cambios o variabilidad significativa para los tratamientos con y  $\text{TiO}_2$  (CV= 27%) y  $\text{TiO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$  (CV= 24%).

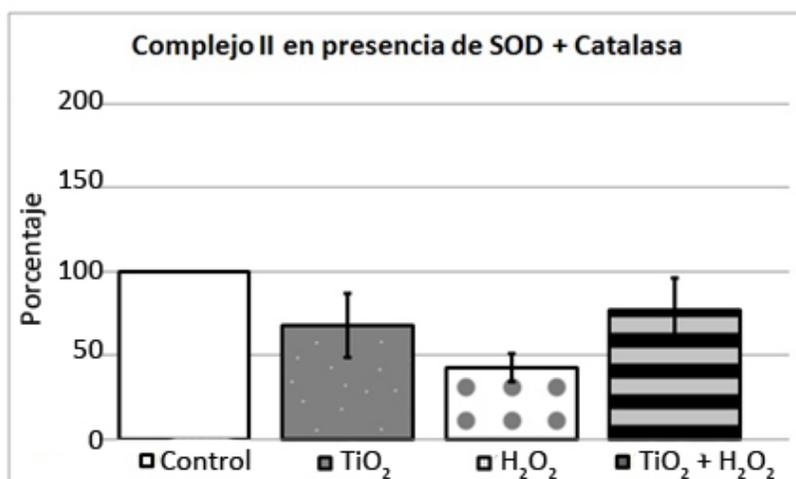
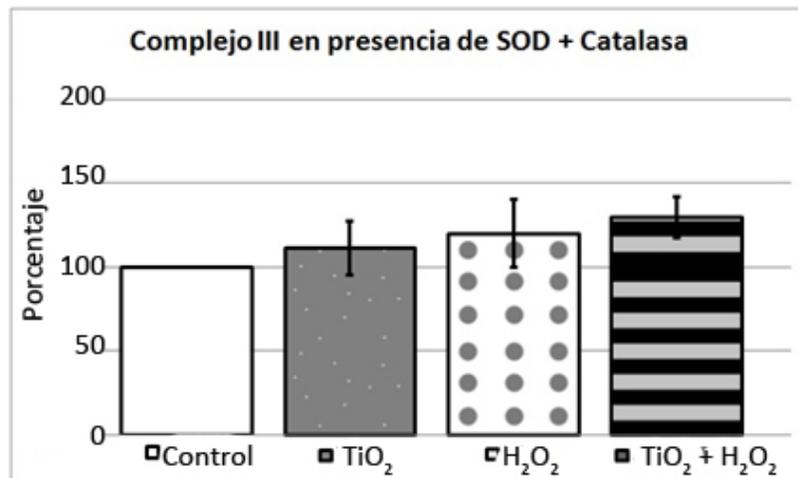


Figura 24. Actividad de Succinato deshidrogenasa (complejo II) de mitocondrias extraídas de pulmón de rata en presencia de SOD y Catalasa luego de sus distintos tratamientos con  $0.2\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  de proteína durante 30min (CV = 27%),  $12\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  durante 60min (CV = 19%) y  $0.2\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  de proteína durante 30min seguido de a  $12\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  durante 60 min (CV = 24%). Datos normalizados con respecto a la actividad del control (n=3).

#### 5.4.2 Actividad de los complejos III y IV en presencia de SOD y Catalasa

Las mitocondrias sin tratamiento presentaron una actividad de ubiquinol citocromo c oxidoreductasa promedio de 194.10 nmol cit c reducido  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (con una desviación estándar de 105.09 unidades [n=3]), en presencia de SOD y Catalasa, presentan una actividad promedio de 170.3 nmol cit c reducido  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (con una desviación estándar de 74.06 unidades [n=3]). Los datos de las actividades fueron normalizados, expresándose en porcentaje de actividad con respecto a las mitocondrias control para cada tratamiento como se muestra en la *Figura 24*. Las mitocondrias con los distintos tratamientos,  $\text{TiO}_2$  (CV= 14%),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (CV= 16%) y  $\text{TiO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$  (CV= 9%) presentaron baja variabilidad en presencia de SOD y Catalasa.



*Figura 25. Actividad de ubiquinol citocromo c oxidoreductasa (complejo III) de mitocondrias extraídas de pulmón de rata en presencia de SOD y Catalasa luego de sus distintos tratamientos con  $0.2\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  de proteína durante 30min (CV = 14%),  $12\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  durante 60min (CV = 16%) y  $0.2\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  de proteína durante 30min seguido de a  $12\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  durante 60 min (CV = 9%). Datos normalizados con respecto a la actividad del control (n=3).*

Las mitocondrias sin tratamiento presentaron una actividad de citocromo c oxidasa promedio de 256.4 nmol cit c oxidado  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (con una desviación estándar de 63.94 unidades [n=3]), mientras que en presencia de SOD y Catalasa presentaron una actividad promedio de 271.35 nmol cit c oxidado  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (con una desviación estándar de 76.22 unidades [n=3]). Los datos de las actividades fueron normalizados, expresándose en porcentaje de actividad con respecto a las mitocondrias control para cada tratamiento como se muestra en la *Figura 25*. Las mitocondrias con los distintos tratamientos,  $\text{TiO}_2$  (CV= 25%),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (CV= 24%) y  $\text{TiO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$  (CV= 25%) presentaron una alta variabilidad aún en presencia de SOD y Catalasa.

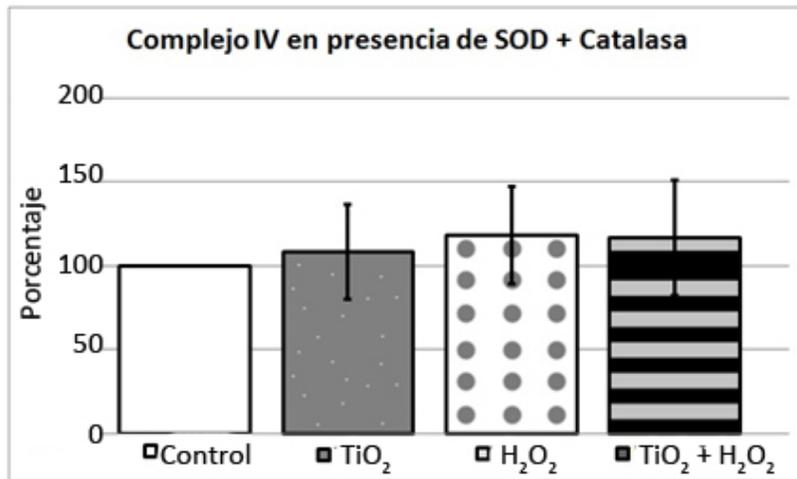


Figura 26. Actividad de citocromo c oxidasa (complejo IV) de mitocondrias extraídas de pulmón de rata en presencia de SOD y Catalasa luego de sus distintos tratamientos con 0.2µg TiO<sub>2</sub>/mg de proteína durante 30min (CV = 25%), 12µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 60min (CV = 24%) y 0.2µg TiO<sub>2</sub>/mg de proteína durante 30min seguido de a 12µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 60 min (CV = 25%). Datos normalizados con respecto a la actividad del control (n=3).

### 5.5 Actividades remanentes de los complejos respiratorios.

En los distintos ensayos para medir la actividad de los complejos respiratorios, se hizo uso de los inhibidores específicos para cada complejo, por ejemplo, para el Complejo I se utilizó a la rotenona, el TTFA para el complejo II, la antimicina para el Complejo III y el cianuro para el Complejo IV. Con ello se obtuvieron las actividades remanentes del mismo como se muestra en la Figura 26. En este caso, se observó que las actividad remanente promedio de los controles de los distintos complejos respiratorios son menores en todos los casos con respecto a las actividades remanentes de los mismos con los tratamientos de TiO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y TiO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En todos los casos la dispersión fue muy alta.

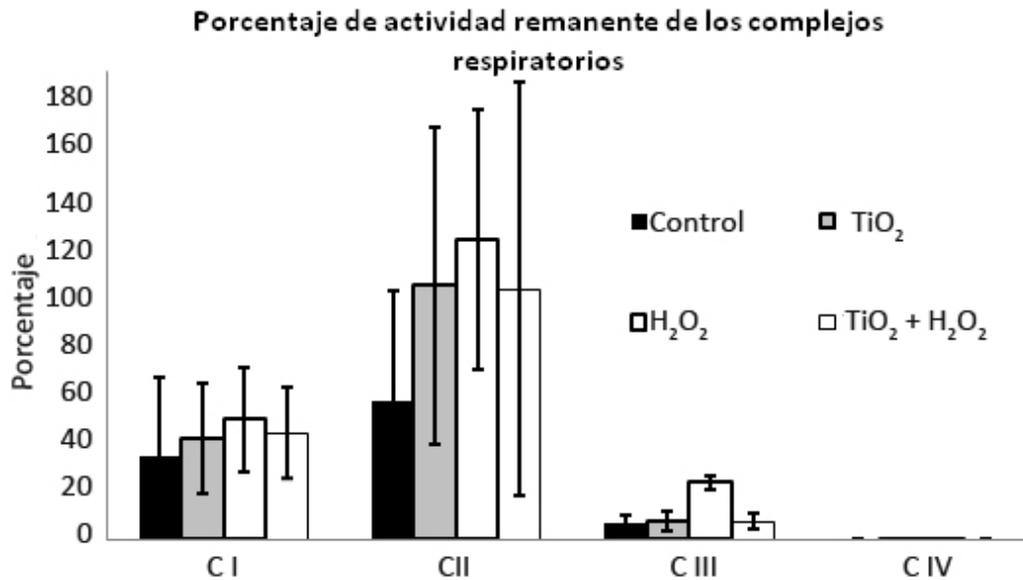
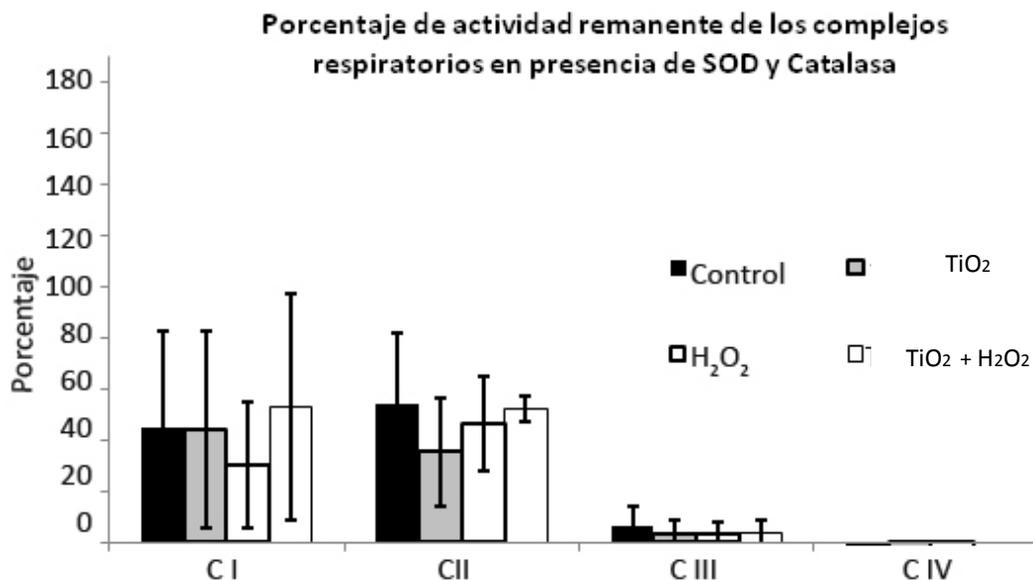


Figura 27. Porcentaje de actividad remanente de los cuatro complejos respiratorios (n=3, coeficientes de variación de 85% CI control, 88% CI TiO<sub>2</sub>, 78% CI H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 87% CI TiO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 51% CII control, 83% CII TiO<sub>2</sub>, 58% CII H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 44% CII TiO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 53% CIII control, 54% CIII TiO<sub>2</sub>, 13% CIII H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 42% CIII TiO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Debido a que se observó una alta dispersión en los valores de actividades remanentes, se decidió obtener la actividad remanente de los cuatro complejos respiratorios en presencia de SOD y Catalasa para saber si la adición de inhibidores también era una fuente de radicales libres en nuestro ensayo *figura 27*, en este caso, observamos que las actividades remanentes de los complejos respiratorios luego de los tratamientos de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{TiO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ , fueron menores o iguales a la actividad que presenta el control, de la misma manera la presencia de SOD y Catalasa en el ensayo disminuyó la dispersión presente en los datos de las actividades remanentes.



*Figura 28. Porcentaje de actividad remanente en presencia de inhibidores específicos de los cuatro complejos respiratorios y en presencia de SOD y Catalasa durante el ensayo. (n=3, coeficientes de variación de 85% CI control, 86% CI  $\text{TiO}_2$ , 81% CI  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 83% CI  $\text{TiO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ ; 51% CII control, 60% CII  $\text{TiO}_2$ , 40% CII  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 8% CII  $\text{TiO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ ; 103% CIII control, 140% CIII  $\text{TiO}_2$ , 152% CIII  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 136% CIII  $\text{TiO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ ).*

### 5.6 Geles hrcNE

Los geles hrcNE permiten solubilizar con un detergente no iónico (DDM) los complejos respiratorios asociados en supercomplejos para comparar las interacciones ya reportadas para las mitocondrias extraídas de corazón, con respecto a las que presentan las mitocondrias extraídas de pulmón, así como para poder observar si es que existe algún cambio en estas asociaciones luego de la interacción con los distintos tratamientos. A continuación se muestran los geles hrcNE de corazón y de pulmón de rata utilizados para determinar la cantidad adecuada de proteína que permite obtener la mejor definición en las bandas, utilizando la menor cantidad de proteína posible.

En la *Figura 28* se muestra el gel de primera dimensión claro nativo cargado con cantidades crecientes de proteína solubilizada de mitocondrias extraídas de corazón de rata. En el carril A con 1500 $\mu\text{g}$  de proteína, se identificaron 8 bandas de proteína, en el carril B con 1000 $\mu\text{g}$  de proteína, se observaron 7 distintas bandas, en el carril C con 800 $\mu\text{g}$  de proteína, se lograron identificar 11 bandas, en el carril D con 400 $\mu\text{g}$  de proteína, se lograron identificar 12 bandas, y por último en los carriles E y F con 200 $\mu\text{g}$  y 100 $\mu\text{g}$  de proteína se lograron identificar el máximo con 14 bandas (\*\* bandas que por la

cantidad de proteína pueden no ser identificables en todos los carriles). Con estos geles se determinó que la cantidad adecuada de proteína mitocondrial solubilizada de corazón era de 100µg.

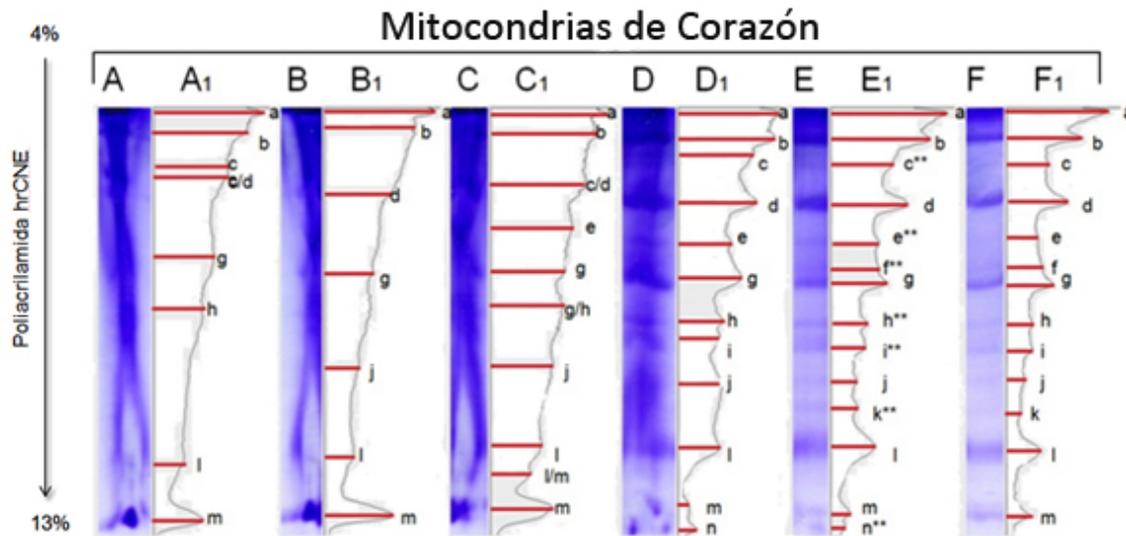


Figura 29. Gel hrCNE con un gradiente de poliacrilamida del 4 al 13%. Mitochondrias de corazón de rata (MC) solubilizadas con 2.5 mg DDM/mg proteína. Tinción con Coomassie y su respectivo perfil densitométrico (Subíndice 1) bandas que por la cantidad de proteína pueden no ser identificables en todos los carriles. Carril A: 1500µg de proteína de mitochondrias extraídas de corazón de rata; Carril B: 1000µg de proteína de mitochondrias extraídas de corazón de rata; Carril C: 800µg de proteína de mitochondrias extraídas de corazón de rata; Carril D: 400µg de proteína de mitochondrias extraídas de corazón de rata; Carril E: 200µg de proteína de mitochondrias extraídas de corazón de rata; Carril F: 100µg de proteína de mitochondrias extraídas de corazón de rata.

En la Figura 29 se muestra en el carril A un gel de primera dimensión claro nativo cargado con 100µg proteína solubilizada de mitochondrias extraídas de corazón de rata. En los carriles subsiguientes se muestra la primera dimensión de un gel claro nativo cargado con cantidades crecientes de proteína solubilizada de mitochondrias extraídas de pulmón. En el carril B con 800µg de proteína, se identificaron 9 bandas de proteína, en el carril C con 400µg de proteína, se observaron 14 distintas bandas, en el carril D con 200µg de proteína, se lograron identificar 11 bandas y en el carril E con 100µg de proteína, se lograron identificar 10 bandas. Con estos geles se determinó que la cantidad adecuada de proteína mitocondrial solubilizada de pulmón de rata era de 400µg para observar con claridad las bandas de proteína en los geles nativos.

Posteriormente se realizaron pruebas de actividad en gel de los complejos respiratorios, para determinar histoquímicamente la composición activa de los supercomplejos separados en la electroforesis. En la Figura 30 se presentan los geles con actividad de los complejos I, III, IV y V con 400µg de proteína de mitochondrias aisladas de pulmón. La actividad de los complejos respiratorios se identificó por la precipitación de un reactivo colorido en diferentes zonas del gel de primera dimensión. Es necesario mencionar que no se obtuvo tinción de actividad en gel para el complejo II siguiendo el método descrito anteriormente (Zerbetto et al., 1997, Wittig et al., 2007b).

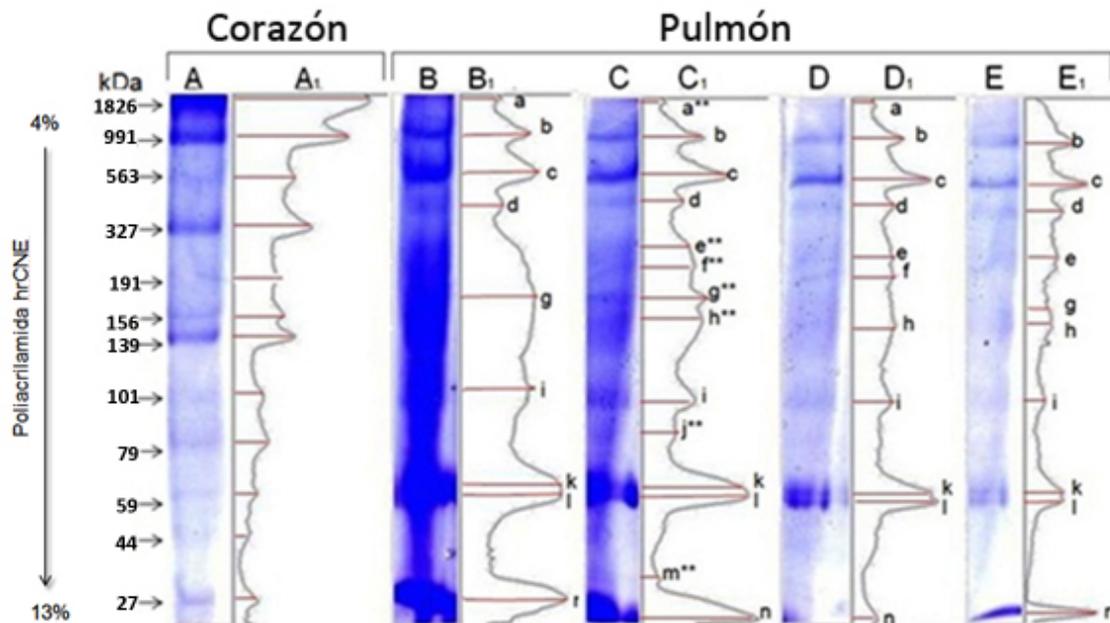


Figura 30. Gel hrcNE con un gradiente de poliacrilamida del 4 al 13%. Mitochondrias de corazón (MC) y de pulmón (MP) de rata solubilizadas a 2.5 mg DDM/mg proteína. Tinción con Coomassie y su respectivo perfil densitométrico (Subíndice 1). Carril A 100µg de proteína de mitocondrias de corazón; Carril B: 800µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón; Carril C: 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón; Carril D: 200µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón; Carril E: 100µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón.

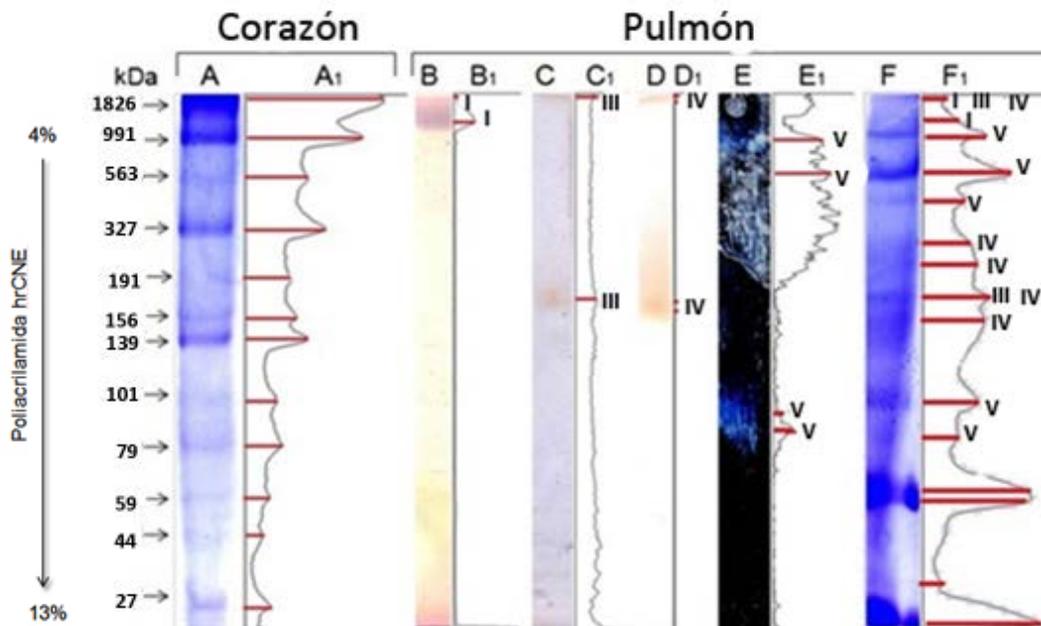


Figura 31. Gel hrcNE con un gradiente del 4 al 13% de poliacrilamida. Mitochondrias de corazón (MC) y mitocondrias de pulmón (MP) de rata solubilizadas con 2.5 mg DDM/mg proteína. Perfil densitométrico (Subíndice 1). Carril A: 100µg de proteína de mitocondrias extraídas de corazón de rata, tinción con Coomassie; Carril B: 400µg de proteína de Mitocondrias de pulmón, con tinción de actividad histoquímica del complejo I; Carril C: 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón de rata, con tinción de actividad histoquímica para el complejo III; Carril D: 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón de rata con tinción de actividad histoquímica para el complejo IV; Carril E: 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón de rata, con tinción de actividad histoquímica del complejo V; Carril F: 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón de rata, tinción con Coomassie.

En la *Figura 30* se muestra en el carril A un gel de primera dimensión claro nativo con 100µg proteína del solubilizado de mitocondrias extraídas de corazón de rata. Los pesos moleculares aproximados de las distintas bandas fueron calculados con el software Image Gauge V4.0 y los marcadores de peso molecular preteñidos NIPPON genetics. En los carriles B, C, D y E se muestra la actividad en gel de 400µg de mitocondrias de pulmón, para el complejo I (carril B) presentando 2 bandas de actividad, el complejo III (carril C) con 2 bandas de actividad, el complejo IV (carril D) con 4 bandas de actividad y el complejo V (carril E) con 4 bandas de actividad. En el carril F se muestra la tinción con Coomassie de 400µg de mitocondrias de pulmón, que presentan 14 bandas, señalando en 10 de ellas la zona de actividad de los distintos complejos. En algunos casos, se encontró la actividad de distintos complejos en la misma zona, (I+III+IV; I; V; IV; III+IV; V) que dan prueba de la formación de supercomplejos o de un sólo complejo en distintas zonas del gel.

Una vez establecidas las condiciones de carga de los geles, se realizaron los geles hrCNE para los tres tratamientos, se corrieron muestras de los tres diferentes tratamientos: 0.1µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína; 0.5 µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína; 1 µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína durante 30 minutos para evaluar el efecto que causa el TiO<sub>2</sub> sobre la asociación supramolecular de los complejos respiratorios. Posteriormente, se reveló la presencia de los cinco complejos respiratorios por medio de la técnica de actividad en gel.

En la *Figura 31* se muestra en el carril A la resolución de 12 bandas del solubilizado de mitocondrias extraídas de corazón de rata y en el carril B la resolución de 20 bandas del solubilizado de las mitocondrias de pulmón de rata. En el carril C se muestra la resolución de 19 bandas de proteínas con mitocondrias de pulmón tratadas con 0.1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 minutos, en el carril D se muestra la resolución de 17 bandas de proteína con mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.5µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 minutos y en el carril E se muestra la resolución de 14 bandas con mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 minutos.

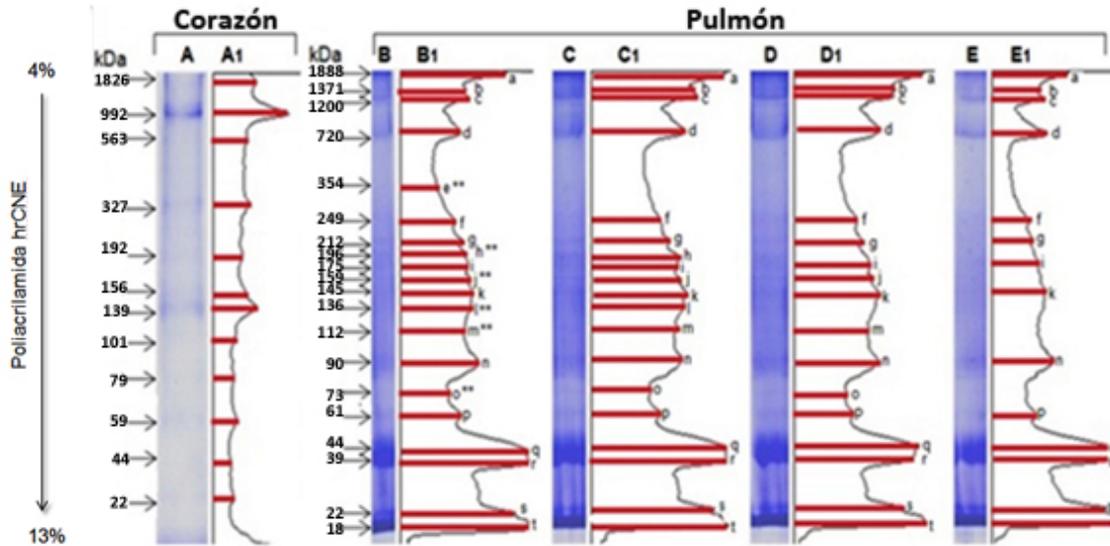


Figura 32. Gel hrCNE con un gradiente del 4 al 13% de poliacrilamida. Mitocondrias de corazón (MC) y mitocondrias de pulmón (MP) de rata solubilizadas con 2.5 mg DDM/mg proteína. Tinción con Coomassie y su respectivo perfil densitométrico (Subíndice 1). Carril A: 100µg de proteína de Mitocondrias de corazón; Carriles B, C y D: 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón. Carril B: sin tratamiento (\*\* bandas identificadas en los gels de mitocondrias de pulmón y pueden no pueden ser identificables en los gels de mitocondrias de pulmón con tratamiento de TiO<sub>2</sub>); Carril C: mitocondrias de pulmón tratadas con 0.1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min; Carril E: mitocondrias de pulmón tratadas con 0.5µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min.

### 5.7 Actividad en gel de los complejos I y II

La actividad en gel de NADH deshidrogenasa se presentó como la precipitación del reactivo NTB, utilizado en este ensayo como aceptor final de electrones. En la Figura 32 se muestra la actividad de NADH deshidrogenasa de mitocondrias de corazón y de pulmón. Para comparar las bandas de actividad contra las bandas de proteína se corrieron también dos carriles con mitocondrias de corazón de rata con 12 bandas de proteína (carril A) y mitocondrias de pulmón de rata con 20 bandas de proteína (carril C). En el carril B se observa que las mitocondrias de corazón presentaron 4 bandas de actividad para el complejo I, que corresponden a las bandas de proteína con masas moleculares en un rango de 130 a 990 kDa. Sin embargo es posible que las bandas de 139kDa, 327kDa y 563kDa hayan sido detectadas debido a una sobre exposición de las proteínas al NBT. En el carril D, las mitocondrias de pulmón presentaron 4 bandas de actividad para el complejo I, en un rango de 720 a 1888 kDa. Sin embargo, con las mitocondrias de pulmón tratadas con 0.1µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína (carril E); 0.5 µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína (Carril F); 1 µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína (Carril G) solo se lograron diferenciar 2 bandas en el mismo rango, las cuales se observaron más claramente gracias al análisis densitométrico.

La actividad en gel de succinato deshidrogenasa se presentó como la precipitación del reactivo NTB, receptor final de electrones. En la Figura 33 se muestra la actividad de succinato deshidrogenasa de mitocondrias de corazón, y de pulmón. Para comparar las bandas de actividad contra las bandas de proteína se corrieron también dos carriles con mitocondrias de corazón de rata con 12 bandas de proteína (carril A) y mitocondrias de pulmón de rata con 20 bandas de proteína (carril C).

La actividad del complejo II no se observó en las mitocondrias de corazón (carril B). Sin embargo, si se obtuvo 1 banda de actividad para las mitocondrias de pulmón (el carril D) en un rango de 30 a 50 kDa. La misma banda de actividad se obtuvo con las mitocondrias de pulmón tratadas con 0.1µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína (carril E); 0.5 µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína (Carril F); 1 µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína (Carril G).

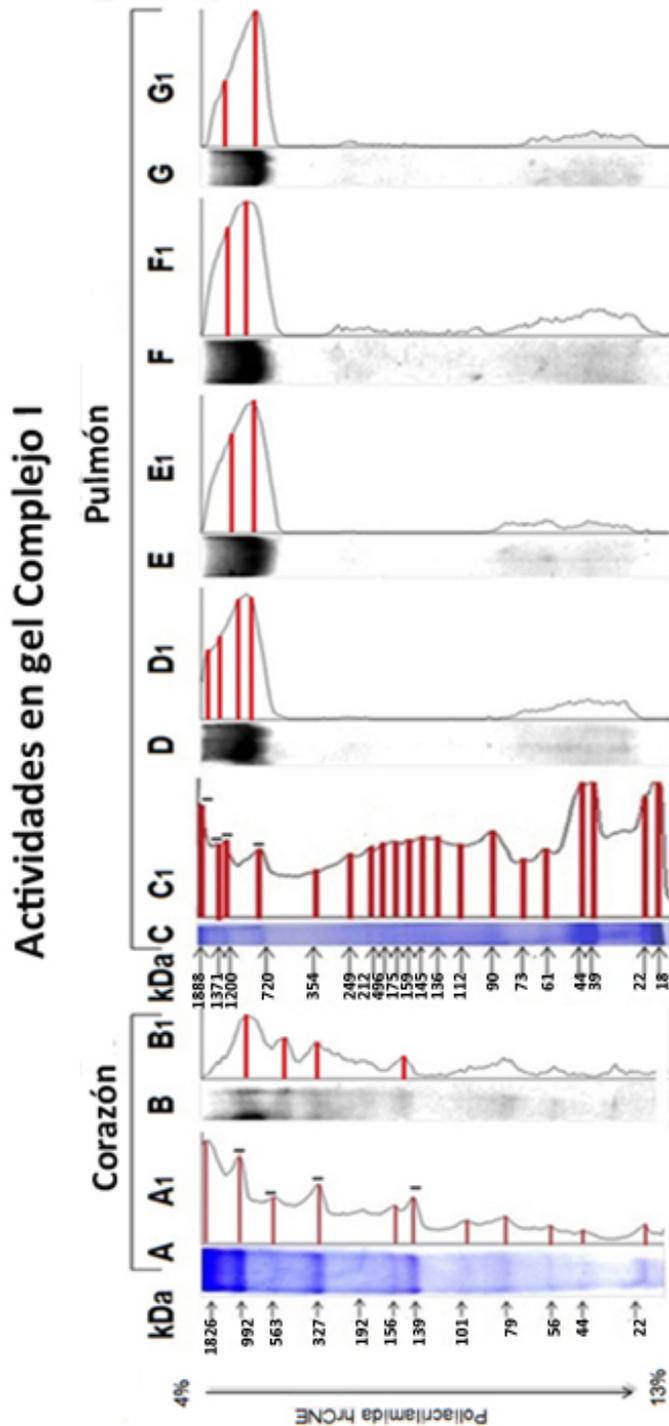


Figura 33. Gel hrcNE con un gradiente del 4 al 13% de poliacrilamida Mitocondrias de corazón (MC) y mitocondrias de pulmón (MP) de rata solubilizadas a 2.5 mg DDM/mg proteína.. Perfil densitométrico (Subíndice 1). Carril A: 100µg de proteína de Mitocondrias de corazón, tinción de Coomassie; Carril B: 100µg de proteína de mitocondrias extraídas de corazón, tinción de actividad histoquímica del complejo I; Carril C, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de Coomassie; Carril D: 400µg mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de actividad histoquímica del complejo I; Carril E, 400µg mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo I; Carril F, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.5µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo I; Carril G, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción actividad histoquímica del complejo I.

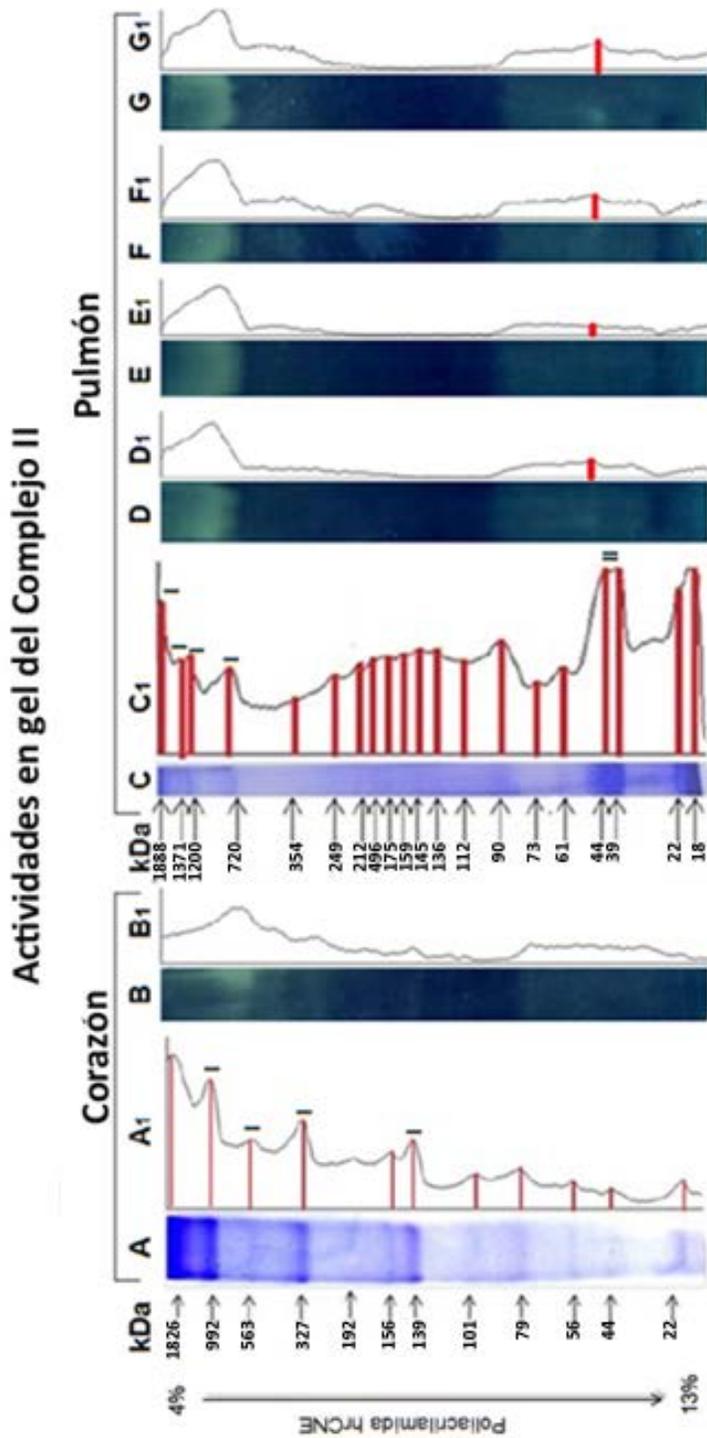


Figura 34. Gel hrCNE con un gradiente del 4 al 13% de poliactilamida. Mitocondrias de corazón (MC) y mitocondrias de pulmón (MP) de rata solubilizadas a 2.5 mg DDM/mg proteína. Perfil densitométrico (Subíndice 1). Carril A: 100µg de proteína de Mitocondrias de corazón, tinción de Coomassie; Carril B: 100µg de proteína de mitocondrias extraídas de corazón, tinción de actividad histoquímica del complejo II; Carril C, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de Coomassie; Carril D: 400µg mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de actividad histoquímica del complejo II; Carril E, 400µg mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo II; Carril F, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.5µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo II; Carril G, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción actividad histoquímica del complejo II.

### 5.8 Actividad en gel complejos III y IV

La actividad en gel de ubiquinol:citocromo *c* oxidoreductasa se presentó como la precipitación de la Benzamidina, dador de electrones. En la *Figura 34* se muestra la actividad del complejo III de mitocondrias de corazón, y de pulmón. Para comparar las bandas de actividad contra las bandas de proteína se corrieron también dos carriles con mitocondrias de corazón de rata con 12 bandas de proteína (carril A) y mitocondrias de pulmón de rata con 20 bandas de proteína (carril C). Se observó 1 banda de actividad para el complejo III con las mitocondrias de corazón con una masa molecular cercana a los 1800 kDa (carril B). Las mitocondrias de pulmón presentaron 1 banda de actividad de 1800 kDa y una banda muy gruesa que va de los 130 a los 250 kDa (carril D). Las mitocondrias de pulmón tratadas con 0.1µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína (carril E) y 0.5 µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína (Carril F) presentaron las mismas bandas de actividad para el complejo III, sin embargo para las mitocondrias de pulmón tratadas con 1 µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína (Carril G) a pesar de presentar ambas bandas, se observó que la banda gruesa de actividad tuvo una masa molecular entre el rango de los 130 a los 190 kDa.

La actividad en gel de citocromo *c* oxidasa inició con la benzamidina reduciendo al complejo III, mientras este a su vez reducía al citocromo *c* quien daría sus electrones al complejo IV. En la *Figura 35* se muestra la actividad del complejo IV de mitocondrias de corazón, y de pulmón. Para comparar las bandas de proteína contra las bandas de actividad específica se muestra en el carril A 100µg de mitocondrias extraídas de corazón de rata con 12 bandas de proteína en total y en el carril C 400µg de mitocondrias de pulmón de rata con 20 bandas de proteína en total. Para el complejo IV se obtuvieron 4 bandas de actividad con las mitocondrias de corazón con masas moleculares de 1800 kDa, 560 kDa, 330 kDa y 140 kDa (carril B). Las mitocondrias de pulmón presentaron 1 banda de actividad de 1800 kDa y un barrido de actividad que va de los 130 a los 250 kDa (carril D). Las mitocondrias de pulmón tratadas con 0.1µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína (carril E) y con 0.5 µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína (Carril F) presentaron las mismas bandas de actividad para el complejo IV sin embargo con las mitocondrias de pulmón tratadas con 1 µg TiO<sub>2</sub>/ mg proteína (Carril G) la banda gruesa mostró una masa molecular menor, entre los 130 a los 190 kDa, y se conservó la banda de alto peso molecular.

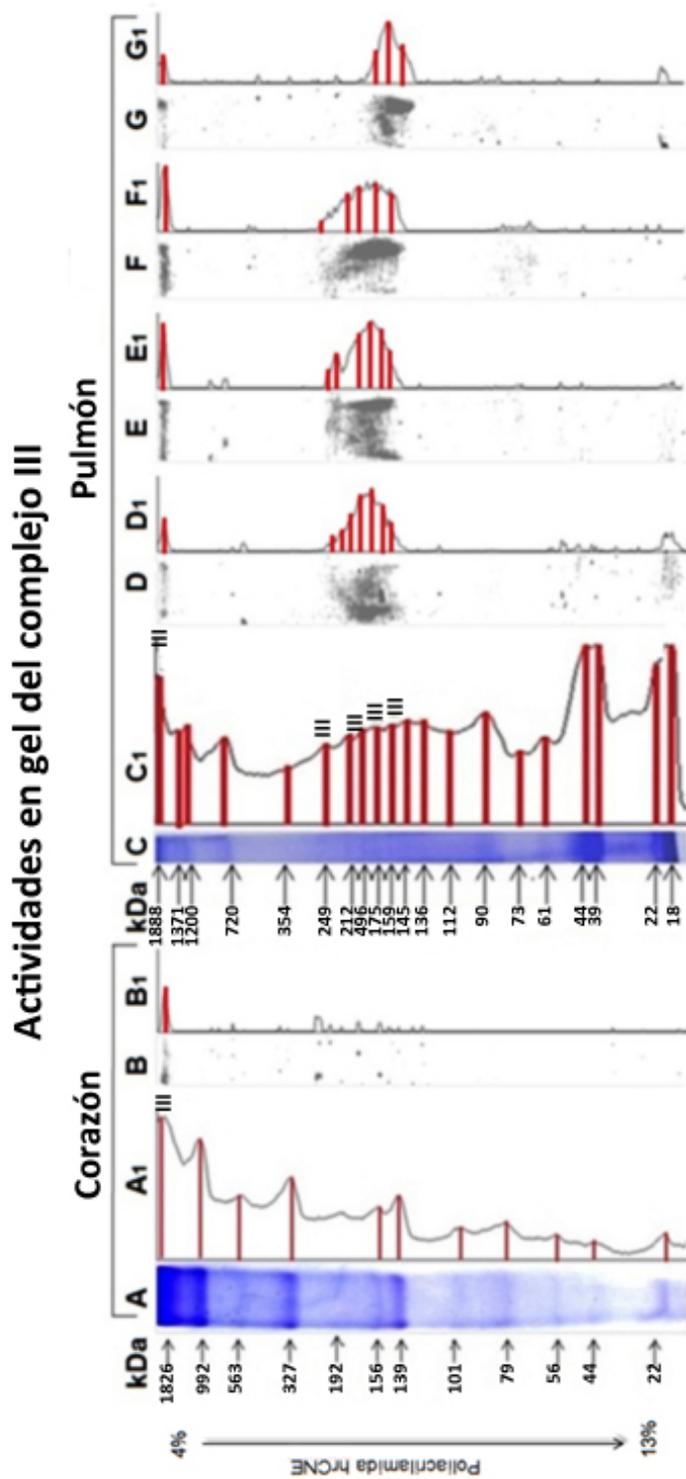


Figura 35. . Gel hrCNE con un gradiente del 4 al 13% de poliacrilamida. Mitocondrias de corazón (MC) y mitocondrias de pulmón (MP) de rata solubilizadas a 2.5 mg DDM/mg proteína. Perfil densitométrico (Subíndice 1). Carril A: 100µg de proteína de Mitocondrias de corazón, tinción de Coomassie; Carril B: 100µg de proteína de mitocondrias extraídas de corazón, tinción de actividad histoquímica del complejo III; Carril C, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de Coomassie; Carril D: 400µg mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de actividad histoquímica del complejo III; Carril E, 400µg mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo III; Carril F, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.5µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo III; Carril G, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción actividad histoquímica del complejo III.



### 5.9 Actividad en gel ATPsintasa

La actividad en gel del complejo V se presentó como la precipitación de fosfatos de plomo, resultado de la hidrólisis de ATP. En la *Figura 36* se muestra la actividad del complejo V o de la porción  $F_1$  de mitocondrias de corazón y de pulmón. A manera de comparación se muestran dos carriles teñidos con azul de Coomassie para apreciar el número de bandas totales obtenidas para mitocondrias extraídas de corazón con 12 bandas de proteína (carril A, 100 $\mu$ g de proteína) y para las mitocondrias de pulmón de rata con 20 bandas (carril C 400 $\mu$ g de de proteína). En el carril B se observan 2 bandas de actividad para el complejo V para mitocondrias de corazón cercanas de los 800 kDa de masa molecular. En el carril D, las mitocondrias de pulmón presentaron 5 bandas de actividad de 700, 350, 200, 150 y 90 kDa. Las mitocondrias de pulmón tratadas con 0.1 $\mu$ g  $TiO_2$ / mg proteína (carril E) y 0.5  $\mu$ g  $TiO_2$ / mg proteína (Carril F) presentaron las mismas bandas de actividad para el complejo V, sin embargo las bandas de actividad de 350 y 200 kDa no se observaron en las mitocondrias de pulmón tratadas con 1  $\mu$ g  $TiO_2$ / mg proteína (Carril G).

### 5.10 Tinción con Tetrametil Bencidina

La presencia de citocromos *a*, *b* y *c* fue revelada con la tinción de Bencidina. A modo de comparación se corrieron muestras de mitocondrias extraídas de corazón de rata teñidas con Coomassie, donde se obtuvieron con 12 bandas de proteína (*Figura 37* carril A 100 $\mu$ g de proteína) y mitocondrias de pulmón de rata teñidas con Coomassie con 20 bandas de proteína (carril C 400 $\mu$ g de proteína). Con las mitocondrias de corazón se teñieron 6 bandas de posibles citocromos (carril B) con masas moleculares cercanas a los 1800, 600, 200, 139, 100, 28 kDa. La banda de 1800 kDa coincide con la actividad del complejo III, mientras que las bandas de 1800, 600 y 200 kDa coinciden con la actividad del complejo IV. Las mitocondrias de pulmón presentaron 8 bandas de posibles citocromos cercanas a los 1800, 1200, 300, 200, 145, 136, 90 y 18 kDa (carril D). Las bandas de 1800 y 200kDa coinciden con la actividad del complejo III, mientras las bandas de 1800, 1200 y 200 coinciden con la actividad del complejo IV. Sin embargo, para las mitocondrias de pulmón tratadas con 0.1 $\mu$ g  $TiO_2$ / mg proteína (carril E), 0.5  $\mu$ g  $TiO_2$ / mg proteína (Carril F) y con 1  $\mu$ g  $TiO_2$ / mg proteína (Carril G) las bandas con tinción positiva fueron difícilmente observables, incluso con el análisis densitométrico. Es necesario mencionar que la tinción también interactuó con el frente de detergente.

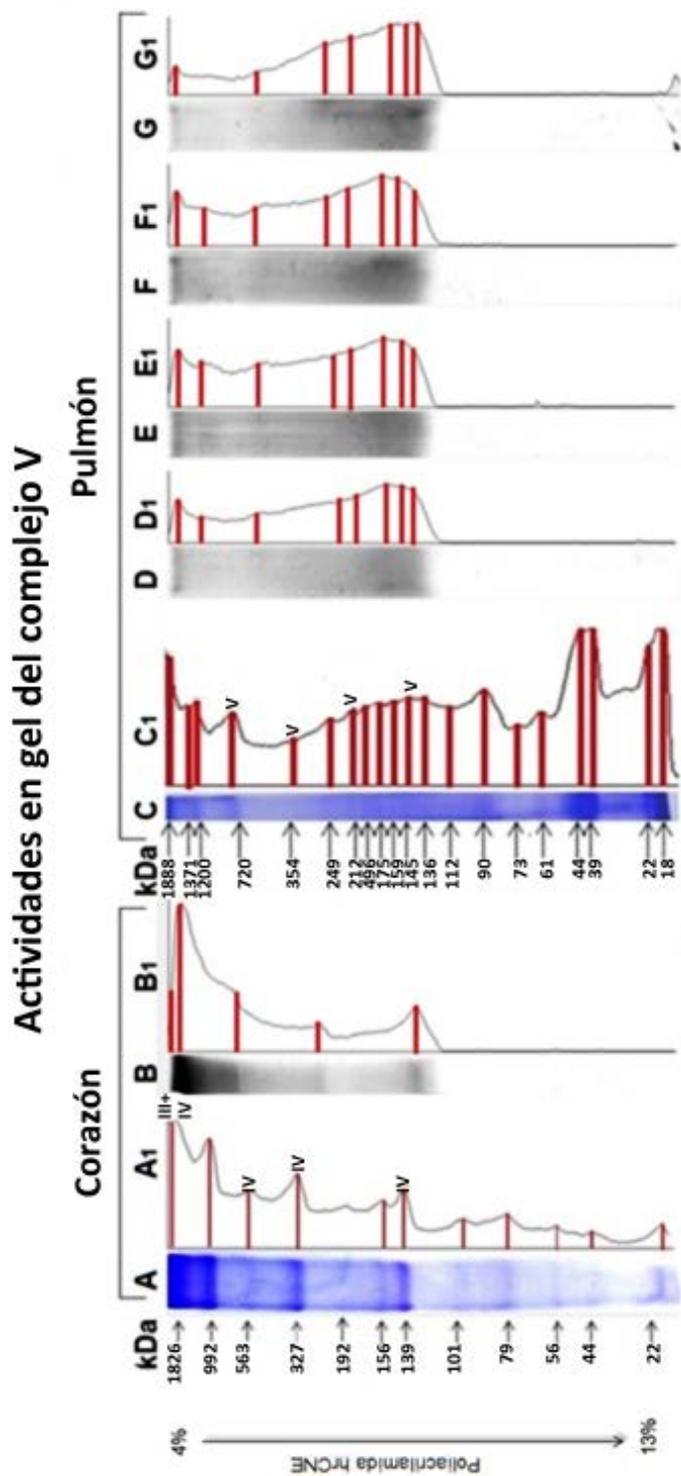


Figura 37. . Gel hrCNE de poliacrilamida con un gradiente del 4 al 13%. Mitocondrias de corazón (MC) y mitocondrias de pulmón (MP) de rata solubilizadas a 2.5 mg DDM/mg proteína. Tinción con Coomassie y su respectivo Perfil densitométrico (Subíndice 1). Carril A: 100µg de proteína de Mitocondrias de corazón, tinción de Coomassie; Carril B: 100µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de actividad histoquímica del complejo V; Carril C, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de Coomassie; Carril D: 400µg mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de actividad histoquímica del complejo V; Carril E, 400µg mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo V; Carril F, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.5µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de actividad histoquímica del complejo IV; Carril G, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción actividad histoquímica del complejo V.

## Tinción con tetrametil bencidina

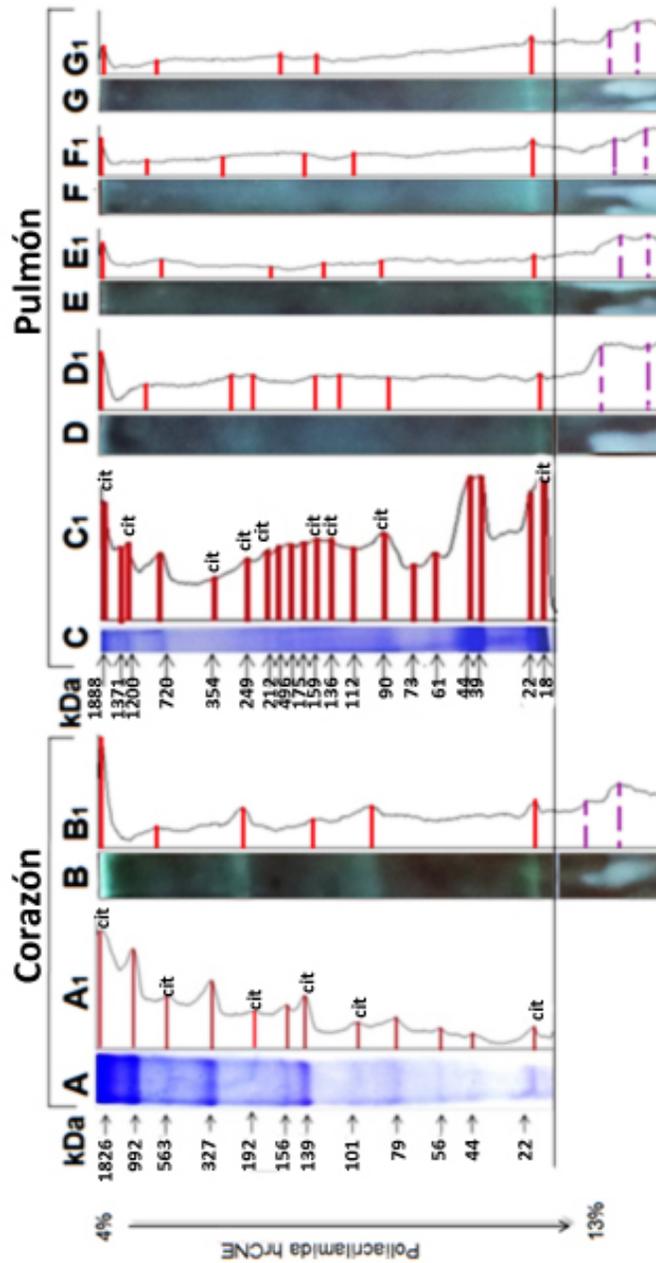


Figura 38. Gel hrCNE de poliacrilamida con un gradiente del 4 al 13%. Mitocondrias de corazón (MC) y mitocondrias de pulmón (MP) de rata solubilizadas a 2.5 mg DDM/mg proteína. Tinción con Coomassie o de Bencidina y su respectivo Perfil densitométrico (Subíndice 1). Carril A: 100µg de proteína de Mitocondrias de corazón, tinción de Coomassie; Carril B: 100µg de proteína de mitocondrias extraídas de corazón, tinción de bencidina; Carril C: 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de Coomassie; Carril D: 400µg mitocondrias extraídas de pulmón, tinción de bencidina; Carril E, 400µg mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de bencidina; Carril F, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 0.5µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de bencidina; Carril G, 400µg de proteína de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, tinción de bencidina.

### 5.11 Geles 2D

Los geles 2D-SDS PAGE permiten separar en condiciones desnaturalizantes a las bandas de proteínas obtenidas en forma nativa en la primera dimensión por hrCNE. De esta manera, es posible identificar la presencia de subunidades de los distintos complejos mitocondriales para a) conocer la composición proteica de cada banda en primera dimensión por hrCNE e identificar a los complejos respiratorios individuales por el número y composición de subunidades, b) comparar la presencia de complejos mitocondriales (o sus subunidades) con las actividades en gel, c) comparar la presencia de complejos mitocondriales entre tratamientos.

Tabla 6. Subunidades representativas de los complejos respiratorios mitocondriales.

Número	Complejo	Nombre	Peso molecular Registrado (KDa)	Peso molecular (KDa) <sup>1</sup>	Peso molecular (KDa) <sup>2</sup>	Peso molecular (KDa) <sup>3</sup>
1	I	75*	77*	76.5	74.8	74.6
2	I	ND5 <sup>+</sup>	63.3 <sup>+</sup>	69.5	65.07	66.34
3	I	ND4 <sup>+</sup>	52.1 <sup>+</sup>	50.6	52.49	58.6
4	I	ND2 <sup>+</sup>	39.3 <sup>+</sup>	----	38.65	----
5	I	ND1 <sup>+</sup>	35.7 <sup>+</sup>	----	34.72	----
6	I	24 <sup>#</sup>	22-25 <sup>#</sup>	23.09	23.21	23.1
7	I	23 <sup>#</sup>	21-23 <sup>#</sup>	21.7	22.23	21.06
8	I	ND3 <sup>+</sup>	13.1 <sup>+</sup>	17.8	17.55	16.74
9	I	ND4L <sup>+</sup>	10.8 <sup>+</sup>	10.1	12.58	----
10	II	SDHA <sup>&amp;</sup>	72.7 <sup>&amp;</sup>	75.17	73.2	78.44
11	II	SDHC <sup>&amp;</sup>	15.5 <sup>&amp;</sup>	15.17	16	17.65
12	II	SDHD <sup>&amp;</sup>	13.5 <sup>&amp;</sup>	13.94	14.47	15.34
13	III	Core I*	49*	----	50.29	49.87
14	III	Core II*	47*	47.7	47.15	46.5
15	III	Cyt b <sup>+</sup>	42.6 <sup>+</sup>	43.3	42.85	42.4
16	III	13*	13.4*	----	14.3	12.05
17	IV	COX I* <sup>+&amp;</sup>	57* <sup>+&amp;</sup>	54.5	58.44	56.11
18	IV	COX II*	35*	31.5	31.32	31.1
19	IV	COX III* <sup>+&amp;</sup>	26* 30 <sup>+&amp;</sup>	26.5	27.4	27.3
20	V	α* <sup>#&amp;</sup>	55* <sup>&amp;</sup> 57 <sup>#</sup>	----	60.3	56.8
21	V	β* <sup>#&amp;</sup>	52* <sup>&amp;</sup> 56 <sup>#</sup>	----	53.6	50.5
22	V	γ* <sup>#&amp;</sup>	30* <sup>&amp;</sup> #	----	29.2	26.3
23	V	d <sup>&amp;</sup>	15 <sup>&amp;</sup>	----	24.2	22.54

<sup>1</sup> Subunidades identificadas en el gel 2D con 100µg de mitocondrias extraídas de corazón de rata. Tinción con plata.

<sup>2</sup> Subunidades identificadas en el gel 2D con 400µg de mitocondrias extraídas de pulmón de rata. Tinción con plata.

<sup>3</sup> Subunidades identificadas en el gel 2D con 400µg de mitocondrias extraídas de pulmón de rata con con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min. Tinción con plata

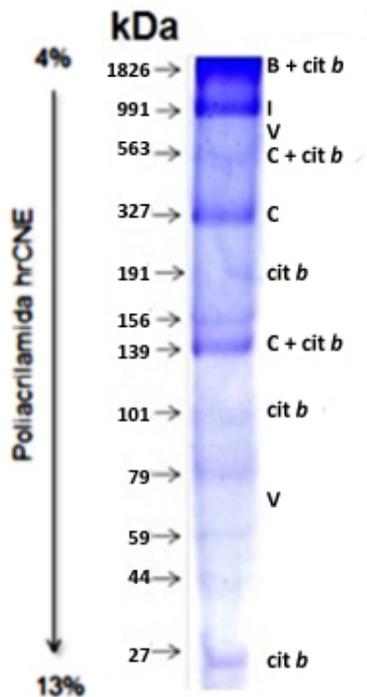
\*H Schägger & Pfeiffer ( 2001)

+Hermann Schägger et al. (2004)

#Stroh et al. (2004)

&Pestronk (2012)

5.11.1 Mitocondrias extraídas de corazón



El gel hrCNE de mitocondrias extraídas de corazón *Figura 38*, presentó un total de 12 bandas de proteína detectadas por la tinción con Coomassie, de las cuales 10 presentaron actividades en gel, por lo que fueron nombradas según la actividad en gel detectada en cada una. La banda B presentó actividad en gel de los complejos III + IV; La banda C presentó actividad de los complejos I + IV; la banda I mostró actividad del complejo I; la banda V presentó actividad del complejo V; las bandas con *cit b* son aquellas que tuvieron reacción con la tinción con bencidina.

El gel 2D-SDS PAGE de mitocondrias extraídas de corazón fue teñido con nitrato de plata *figura 39*. En este gel se identificaron un total de 15 subunidades *ver tabla 5*, de las cuales 7 se adjudicaron al complejo NADH-deshidrogenasa (marcadas con flechas rosas), 3 a la Succinato deshidrogenasa (marcadas con flechas grises), 2 al complejo III (marcadas con flechas azules) y 3 a la citocromo *c* oxidasa (marcadas con flechas rojas). No se identificaron subunidades del complejo ATPsintasa.

*Figura 39. Gel hrCNE 1D de mitocondrias extraídas de corazón de rata.*

Fueron comparados los resultados del análisis del gel 2D-SDS PAGE con el análisis del gel 1D hrCNE y las actividades en gel para los complejos respiratorios, la ATPasa y la tinción con bencidina, *tabla 6*, para conocer la composición de cada banda y su estequiometría tentativa.

Tabla 7. Composición de las bandas de la 1D de las Mitocondrias Extraídas de Corazón de rata.

Banda (gel 1D)	Masa aparente (KDa)	Complejos detectados por Actividad en gel	Composición por Subunidades (gel 2D)	Masa calculada (KDa)	Estequiometría Tentativa
B	1825	III + IV	I + III + IV	1825	$I_1 + III_1 + IV_4$
I	991	I	I + III + IV	1000	$I_1$
V	700	V	0	720	V
C	250	I + IV	III	240	$III_1$
IV	140	I + IV	IV	195	$IV_1$
II	<100	II	II	125*	$II^*$

## Gel 2D-SDS PAGE Mitochondrias extraídas de Corazón

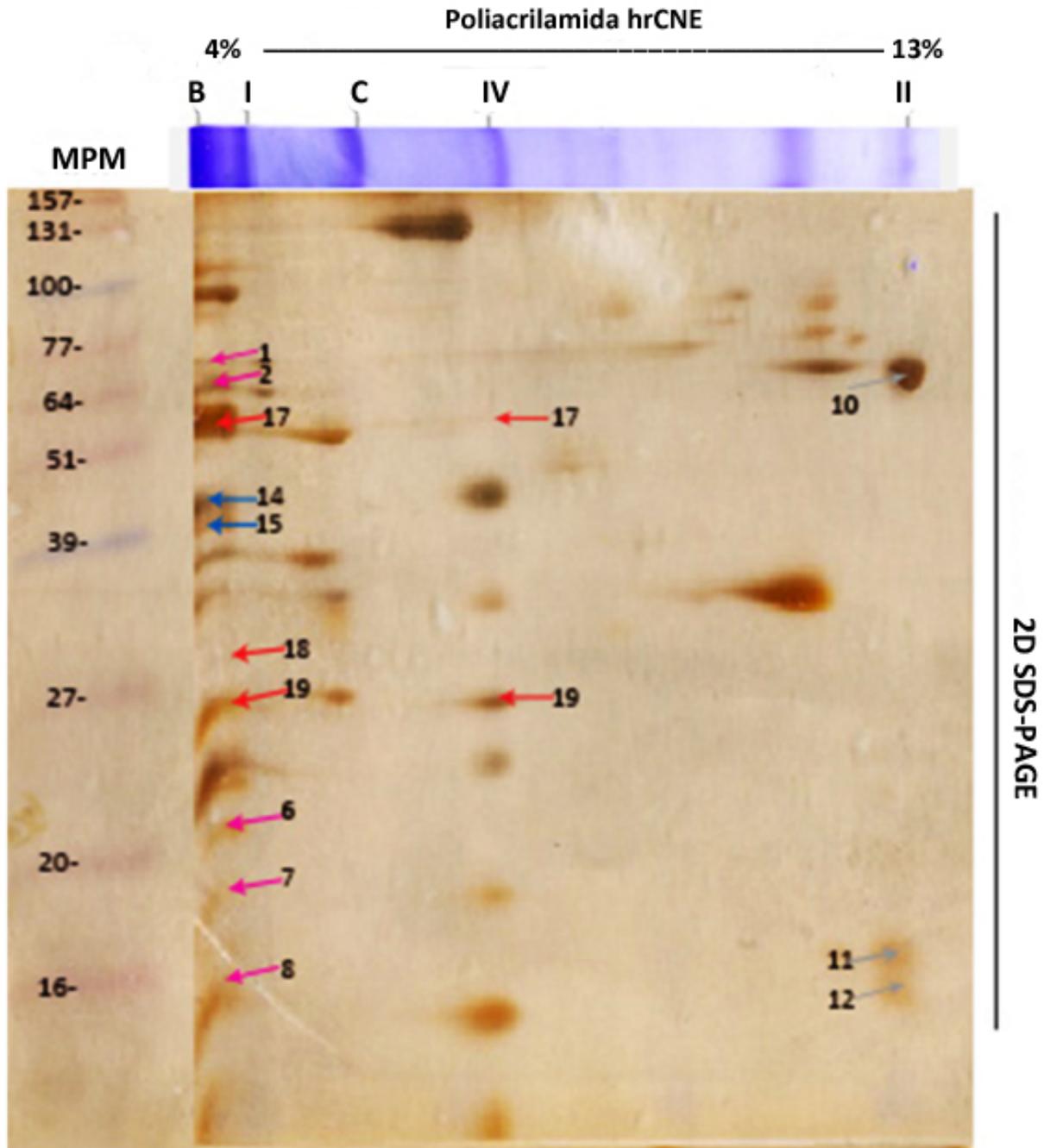


Figura 40. Gel 2D-SDS PAGE 14% de poliacrilamida tinción con plata. En la parte superior del gel se muestra el gel hrCNE 1D tinción con Coomassie de 100µg de mitocondrias extraídas de corazón de rata. Se identificaron distintas subunidades de los complejos respiratorios I-IV marcados con flechas y enumerados (ver tabla 5). En la parte superior se indican los componentes del gel hrCNE 1D, de acuerdo a las subunidades identificadas en el análisis del gel, detectando 6 bandas; B, I, V, C, IV y II (ver tabla 6).

### 5.11.2 Mitocondrias extraídas de pulmón

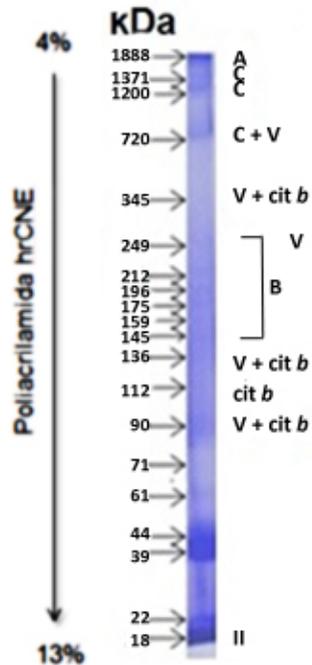


Figura 41. Gel hrCNE 1D de mitocondrias extraídas de pulmón de rata.

El gel hrCNE de mitocondrias extraídas de pulmón *figura 40*, cuenta con un total de 20 bandas de proteína detectadas por la tinción con Coomassie, de las cuales 10 presentaron actividades en gel, por lo que fueron nombradas según la actividad en gel detectada en cada una. La banda A presentó actividad en gel de los complejos I + III + IV; la banda B presentó actividad de los complejos III + IV; La banda C presentó actividad de los complejos I + IV; la banda V presentó actividad del complejo V; la banda II presentó actividad del complejo II las bandas con *cit b* son aquellas que presentaron reacción con la tinción con bencidina.

El gel 2D-SDS PAGE de mitocondrias extraídas de corazón fue teñido con nitrato de plata *figura 41*. Donde se identificaron un total de 23 subunidades *ver tabla 5*, de las cuales 9 pertenecen al complejo NADH-deshidrogenasa (marcadas con flechas rosas), 3 a la Succinato deshidrogenasa (marcadas con flechas verdes), 4 al complejo III (marcadas con flechas grises) y 3 a la citocromo c oxidasa (marcadas con flechas rojas) y 4 a la ATP sintasa (marcadas con flechas negras).

Los resultados del análisis del gel 2D-SDS PAGE fueron comparados con el análisis del gel 1D hrCNE y las actividades en gel para los complejos respiratorios, la ATPasa y la tinción con bencidina, *tabla 7*, para conocer la composición de cada banda y su estequiometría tentativa.

Tabla 8. Composición de las bandas de la 1D de las Mitocondrias Extraídas de Pulmón de rata.

Banda (1D)	Masa aparente (KDa)	Complejos detectados por Actividad en gel	Composición por Subunidades (gel 2D)	Masa calculada (KDa)	Estequiometría tentativa
A <sub>1</sub>	1888	I + III + IV	I + III + IV	1870	I <sub>1</sub> + III <sub>2</sub> + IV <sub>2</sub>
A <sub>2</sub>	1371	I + IV	I + III + IV	1390 1435	I <sub>1</sub> + IV <sub>2</sub> I <sub>1</sub> + III <sub>1</sub> + IV <sub>1</sub>
A <sub>3</sub>	1200	I + IV	I + III + IV	1195 1240	I <sub>1</sub> + IV <sub>1</sub> I <sub>1</sub> + III <sub>1</sub>
V <sub>1</sub>	720	V	V	720	V <sub>1</sub>
V <sub>F0</sub>	354	V	V	351	V <sub>F0</sub>
B	250	III + IV	III + IV	240	III <sub>1</sub> IV <sub>1</sub>
IV	150	IV	IV	195	IV <sub>1</sub>
II	<100	II	II	125*	II

# Gel 2D SDS-PAGE

## Mitocondrias extraídas de Pulmón

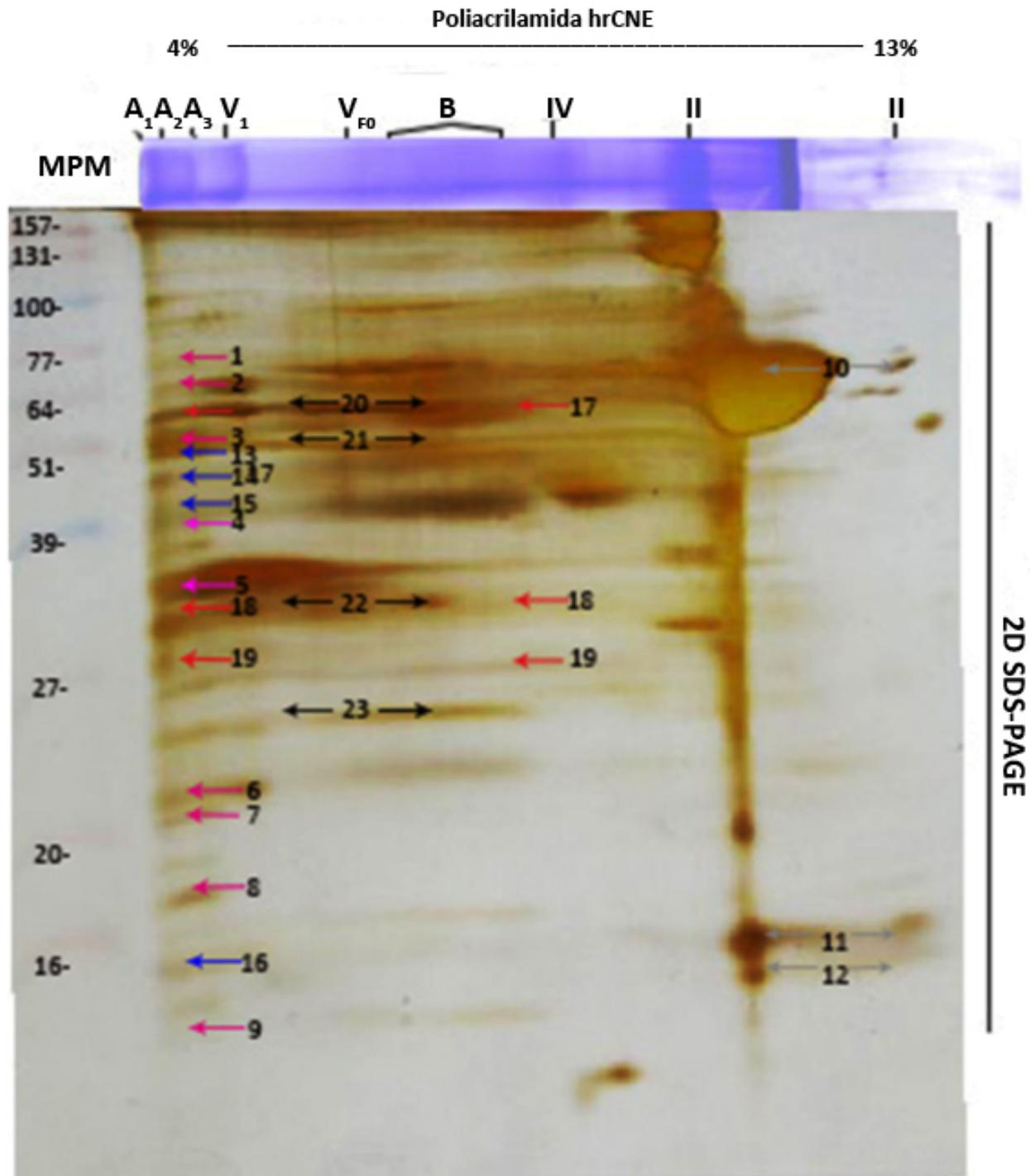
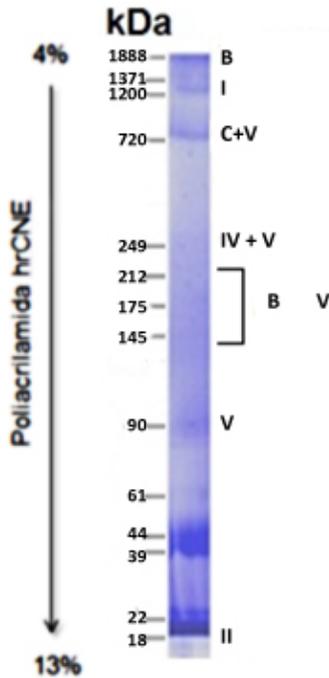


Figura 42. Gel 2D-SDS PAGE 14% de poliacrilamida tinción con plata. En la parte superior del gel se muestra el gel hrCNE 1D tinción con Coomassie de 400µg de mitocondrias extraídas de pulmón de rata. Se identificaron distintas subunidades de los complejos respiratorios I-V marcados con flechas y enumerados (ver tabla 5). En la parte superior se indican los componentes del gel hrCNE 1D, de acuerdo a las subunidades identificadas en el análisis del gel, detectando 8 bandas; A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, V<sub>1</sub>, V<sub>FO</sub>, B, IV y II (ver tabla 7).

### 5.11.3 Mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con TiO<sub>2</sub>



El gel hrCNE de mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min, *figura 42*, cuenta con un total de 14 bandas de proteína detectadas por la tinción con Coomassie, de las cuales 7 presentaron actividades en gel, por lo que fueron nombradas según la actividad en gel detectada en cada una. La banda B presentó actividad de los complejos III + IV; La banda I presentó actividad del complejo I; la banda V presentó actividad del complejo V; la banda II presentó actividad del complejo II.

El gel 2D-SDS PAGE de mitocondrias extraídas de corazón fue teñido con nitrato de plata *figura 43*. Donde se identificaron un total de 20 subunidades *ver tabla 5*, de las cuales 6 pertenecen al complejo NADH-deshidrogenasa (marcadas con flechas rosas), 3 a la Succinato deshidrogenasa (marcadas con flechas verdes), 4 al complejo bc<sub>1</sub> (marcadas con flechas grises) y 3 a la citocromo c oxidasa (marcadas con flechas rojas) y 4 a la ATP sintasa (marcadas con flechas negras).

*Figura 43. Gel hrCNE 1D de mitocondrias extraídas de pulmón de rata tratadas con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 min*

Los resultados del análisis del gel 2D-SDS PAGE fueron comparados con el análisis del gel 1D hrCNE y las actividades en gel para los complejos respiratorios, la

ATPasa y la tinción con bencidina, *tabla 8*, para conocer la composición de cada banda y su estequiometría tentativa.

**Tabla 8. Composición de las bandas de la 1D de las Mitocondrias Extraídas de Pulmón de rata tratadas con 1µg de TiO<sub>2</sub> durante 30 minutos.**

Banda (1D)	Masa aparente (KDa)	Complejos detectados por Actividad en gel	Composición por Subunidades (gel 2D)	Masa calculada (KDa)	Estequiometría tentativa
A	1888	III + IV	I + III + IV	1870	I <sub>1</sub> + III <sub>2</sub> + IV <sub>2</sub>
I	1371	I	I + III + IV	1390	I <sub>1</sub> + IV <sub>2</sub>
C	1200	I + IV	I + IV	1195	I <sub>1</sub> + IV <sub>1</sub>
V <sub>1</sub>	720	V	V	720	V <sub>1</sub>
B	250	III + IV	III + IV	240	III <sub>1</sub> IV <sub>1</sub>
IV	140	IV	IV	195	IV <sub>1</sub>
II	<100	II	II	125*	II

# Gel 2D SDS-PAGE

## Mitocondrias extraídas de Pulmón tratadas con $\text{TiO}_2$

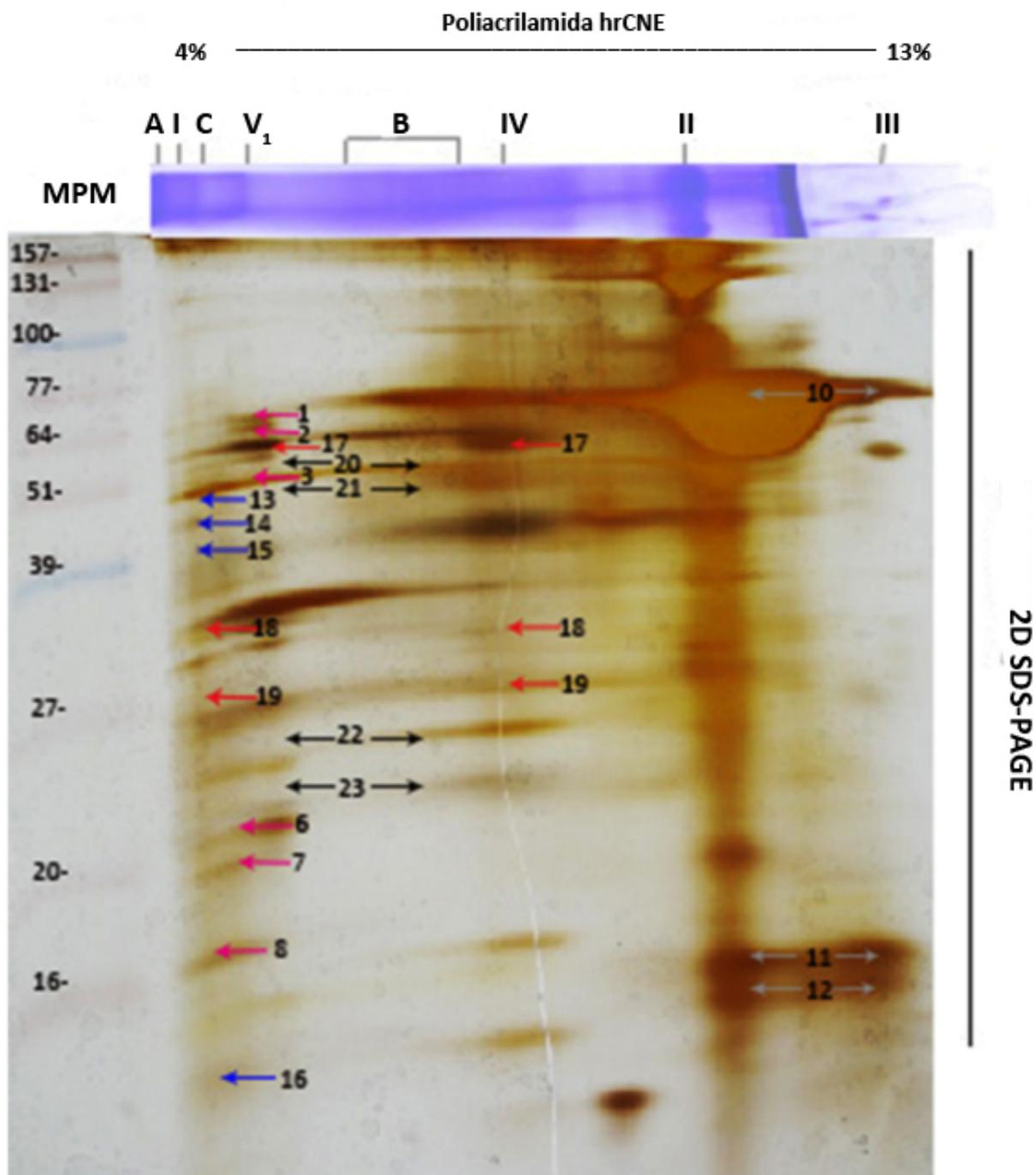


Figura 44. Gel 2D-SDS PAGE 14% de poliacrilamida tinción con plata. En la parte superior del gel se muestra el gel hrCNE 1D tinción con Coomassie de 400µg de mitocondrias extraídas de pulmón de rata tratadas con 1µg de  $\text{TiO}_2$  durante 30 minutos. Se identificaron distintas subunidades de los complejos respiratorios I-V marcados con flechas y enumerados (ver tabla 5). En la parte superior se indican los componentes del gel hrCNE 1D, de acuerdo a las subunidades identificadas en el análisis del gel, detectando 7 bandas; A, I, C, V<sub>1</sub>, B, IV y II (ver tabla 8).

## 6. Discusión

En la actualidad son escasos los trabajos realizados con mitocondrias extraídas de pulmón de rata, debido a la dificultad y a los elevados costos de su obtención, por lo que se compararon los datos con mitocondrias extraídas de corazón, un tejido ampliamente estudiado. Al comparar los métodos de extracción, es necesario mencionar que las diferencias en los métodos utilizados para mitocondrias de distintos órganos se deben a su composición proteica y a su contenido subcelular (Kaye, Mazurkiewicz, & Henrikson, 1997; Scheffler & Allison, 2009). Esto se pudo comprobar al extraer las mitocondrias de pulmón de rata que mostraron una distorsión en el espectro diferencial de absorción causada por la presencia de oxihemoglobina contaminando la preparación. Las mitocondrias fueron lavadas con un medio Tris-KCl para poder tener una lectura clara de la cantidad de citocromo *a* presente, proceso que no fue necesario para las mitocondrias extraídas de corazón de rata. También se encontró que las mitocondrias de pulmón presentan una menor cantidad de citocromos *a*, *b* y *c*, lo cual explica que se hayan encontrado diferencias entre la actividad y la expresión de los complejos respiratorios de mitocondrias extraídas de distintos órganos (McMurtry and Michelakis, 2004).

Para los geles nativos, de mitocondrias extraídas de pulmón se pudieron distinguir solamente 19 bandas para las mitocondrias tratadas con 0.1  $\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  proteína, 17 para mitocondrias tratadas con 0.5  $\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  proteína y 14 para las mitocondrias tratadas con 1  $\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  proteína. Es necesario destacar que las bandas que no pudieron ser identificadas con 0.1  $\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  proteína tampoco pudieron ser identificadas al incrementar la concentración a 0.5  $\mu\text{g}$  y 1  $\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  proteína, estos resultados indican que el daño provocado por NP  $\text{TiO}_2$  incrementa al aumentarr la concentración de las mismas.

En el ensayo de actividad del complejo I, se obtuvo una amplia desviación estándar en la actividad en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , esta desviación fue disminuida en los ensayos con SOD y Catalasa. El inhibidor utilizado para este complejo fue la rotenona, inhibidor tipo A que induce un incremento en la formación de ROS por el complejo (Fato et al., 2009), con lo que se explica el aumento en la desviación estándar que presenta la actividad remanente del complejo I, aún en presencia de SOD y Catalasa para todos los tratamientos.

La actividad en gel hrcNE del complejo I de mitocondrias extraídas de pulmón de rata se obtuvo en 4 bandas, de las cuales solo se obtuvieron 2 en las mitocondrias tratadas con NP  $\text{TiO}_2$ . Ya que estas 4 bandas fueron teñidas con coomassie en todos los carriles de mitocondrias extraídas de pulmón, el que se mantenga la banda del supercomplejo, pero ésta no tenga reacción con el sustrato luego de los distintos tratamientos con NP  $\text{TiO}_2$ , indica que éstas últimas alteran de alguna forma la actividad del complejo I, sin alterar su estructura supramolecular.

El complejo II es una proteína tanto del ciclo de Krebs como de la fosforilación oxidativa (Hederstedt, 2003), por lo que resultó interesante que su actividad control fue muy baja (6.6% con respecto a la actividad presentada por el complejo I). Estos datos son importantes ya que coinciden con la información de que la actividad del complejo II posee una actividad baja o nula en mitocondrias extraídas de los vasos pulmonares (Paddenberg et al., 2003). Al realizar el ensayo en presencia de SOD y Catalasa, la desviación estándar disminuyó para todos los tratamientos. En presencia del inhibidor específico TTFA para el complejo II, las actividades con nuestros tratamientos se vieron disminuidas en presencia de SOD y Catalasa, por lo que inducimos, la presencia de nuestros tratamientos provoca la formación de ROS por el complejo II.

En los geles hrCNE, solo se obtuvo una banda de escasa actividad del complejo II para mitocondrias extraídas de pulmón (40 kDa). Estos datos concuerdan con la baja actividad reportada, y encontrada en el presente trabajo para mitocondrias extraídas de tejido pulmonar. Por lo anterior, se decidió utilizar a la tinción con bencidina que presentó reacción en las zonas del gel donde hubo actividad del complejo II, III y IV, debido a los citocromos que presenta cada complejo, así como una señal muy fuerte en el frente del gel.

La actividad del complejo III se vio disminuida en presencia de los tratamientos con  $\text{TiO}_2$ , debido a la formación de ROS que oxidaba el sustrato al tiempo que el complejo lo reducía. Esto explica el por qué al implementar SOD y Catalasa en nuestro estudio, la actividad se ve aumentada.

La actividad en gel hrCNE del complejo III de mitocondrias extraídas de pulmón se obtuvo una de 1880 kDa y 7 entre los 150 y 250 kDa de masa molecular. Las bandas teñidas con coomassie y por actividad histoquímica para el complejo III, entre los 150 y los 250 kDa en forma de barrido, que podría corresponder a una sobre exposición a las tinciones, o al dímero funcional con pérdida de distintas subunidades ya sea por la cantidad de detergente utilizado o el tiempo en que las mitocondrias fueron expuestas al mismo (Scheffler & Allison, 2009). La banda de 1800 kDa con actividad de complejo III se atribuyó al supercomplejo I-III-IV y se observó actividad en todas las cantidades de  $\text{TiO}_2$  excepto en la más alta de 1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína. Es posible que la ausencia de esta banda sea indicio de una alteración supramolecular asociada al complejo III. Las mitocondrias tratadas con 0.1  $\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  proteína presentaron 6 de las 7 bandas de actividad de menor masa molecular, con 0.5  $\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  proteína se obtuvieron 5 bandas y con 1  $\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  proteína solo se observaron 3 bandas de actividad. En este caso podemos afirmar que a mayor cantidad de NP  $\text{TiO}_2$  sobre las mitocondrias, las bandas de actividad del complejo III desaparecen.

El complejo IV presentó una disminución de su actividad en presencia de los tres distintos tratamientos, SOD y Catalasa Este dato puede indicar la formación de radicales libres causados por la presencia de los tres distintos tratamientos, lo que propició una fuerte variación en la actividad del complejo. Sin embargo no se presentaron cambios en las actividades

remanentes en presencia del inhibidor cianuro, el cual es un inhibidor fuerte del complejo IV y es probable que no muestre la formación de radicales libres.

La actividad del complejo IV en gel hrCNE de mitocondrias extraídas de pulmón se obtuvieron 8 bandas de actividad en bandas que van desde los 1880 a los 150 kDa. Solo con el tratamiento con  $1\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  proteína se observó la pérdida de la actividad del complejo IV en la banda de 1200 kDa. Debido a que con azul de Coomassie sí se observó la banda del supercomplejo, pero no mostró la actividad del complejo IV, podemos concluir que una concentración de  $1\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  proteína altera de alguna forma la actividad del complejo IV (puede hacer que los hemos o las átomos de cobre se pierdan), sin alterar su estructura supramolecular.

En las mitocondrias extraídas de pulmón se presentaron 5 bandas de actividad. La actividad de las bandas de 700 y 800 kDa se atribuyó al monómero del complejo V, y la presente en 350 kDa a la porción  $F_0$ , por lo que es posible que las otras bandas se deban a sobreexposición al plomo o que sean subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  libres. En presencia de  $1\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  proteína no se observó actividad de ATP para la fracción  $F_0$ , ya que tampoco se observó la banda de 350 kDa en la tinción con Coomassie.

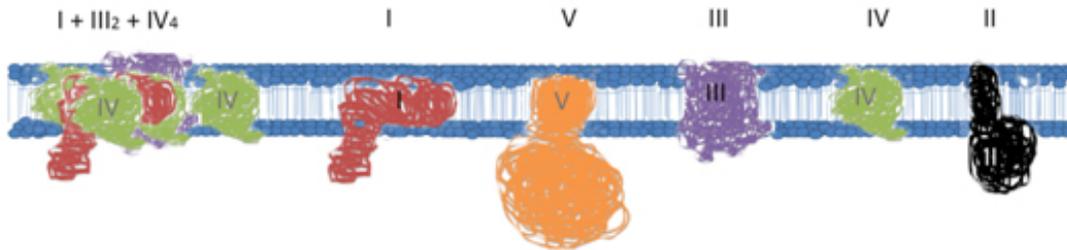
El resultado del análisis realizado se encuentra esquematizado en la *Figura 44*, que permite comparar gráficamente los resultados entre las mitocondrias de corazón, las mitocondrias extraídas de pulmón y las mitocondrias tratadas con  $1\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  proteína durante 30 minutos. Se muestran los monómeros de complejo I, II, IV, V; el dímero  $\text{III}_2$ ; y los supercomplejos  $\text{I+III+IV}$ ,  $\text{I+IV}$ ,  $\text{I+III}$ .

El modelo de la composición de las bandas 1D generado a partir de la estequiometría tentativa para mitocondrias extraídas de corazón de rata, coinciden con algunos de los monómeros y supercomplejos reportados por Acín-Pérez (2008) para mitocondrias extraídas de corazón de bovino; monómeros de los complejos I, IV y V; y un supercomplejo  $\text{I}_1+\text{III}_2+\text{IV}_4$ . La diferencia únicamente con nuestro modelo es que ellos reportan al complejo III como dímero funcional, donde nosotros suponemos una pérdida de subunidades del mismo. Además solo se ha postulado la presencia del monómero del complejo II (Acín-Pérez et al., 2008), el cual hemos calculado.

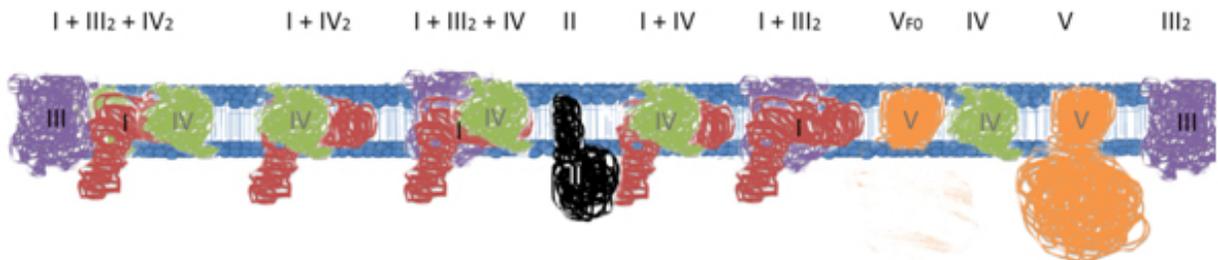
En el modelo de las mitocondrias de pulmón mostrado en la *figura 44b*, observamos que esta coincidió con algunos de los monómeros y supercomplejos reportados por Acín-Pérez et al (2008) y Schagger (2001) en mitocondrias extraídas de corazón de bovino y Nübel et al (2009) en mitocondrias extraídas de *Yarrowia lipolitica*. Se encontró que los complejos I, IV y V aparecieron como monómeros y los supercomplejos  $\text{I}_1+\text{III}_2+\text{IV}_2$ ,  $\text{I}_1+\text{IV}_1$ . La actividad en gel de la fracción  $F_0$  del

complejo V coincide con las actividades reportadas por Wittig et al (2007b). Nuestro resultado se diferencia de lo ya reportado pues se ha calculado la estequiometría tentativa de algunos supercomplejos,  $I_1+IV_2$ ,  $I_1+III_1+IV_1$ ,  $I_1+III_1$ ; el dímero  $III_2$ ; y un monómero, II.

### Mitocondrias extraídas de corazón



### Mitocondrias extraídas de pulmón



### Mitocondrias extraídas de pulmón tratadas con $TiO_2$

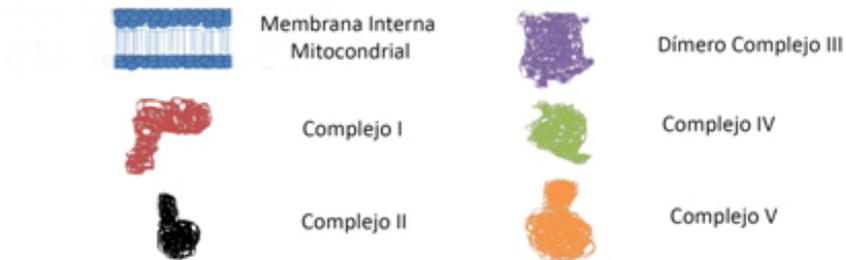
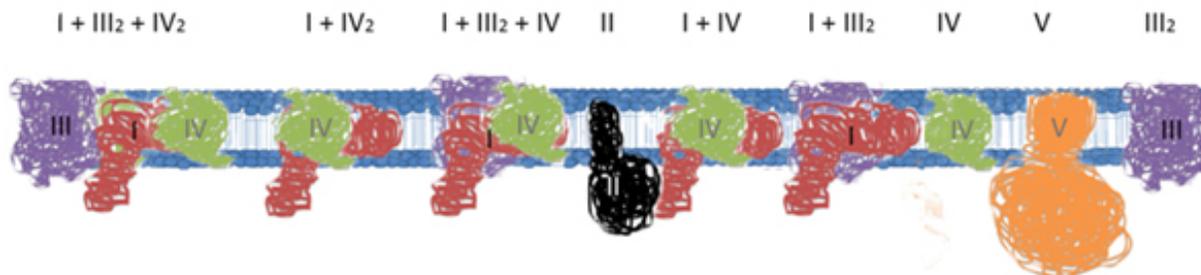


Figura 45. Modelo de la composición de las bandas 1D generado a partir de la estequiometría tentativa calculada en el presente trabajo para a) Mitocondrias extraídas de corazón de rata; b) Mitocondrias extraídas de pulmón de rata; c) Mitocondrias extraídas de pulmón de rata tratadas con  $1\mu g TiO_2/mg$  proteína durante 30 minutos.

El modelo de las mitocondrias extraídas de pulmón de rata tratadas con  $1\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  proteína durante 30 minutos se muestra en la *figura 44c*, en donde se describe que no se presentaron cambios con respecto a los datos reportados para las mitocondrias extraídas de pulmón control, con excepción de la ausencia de actividad y de subunidades de la fracción  $F_0$  del complejo V en la banda de 350 kDa. Además, a pesar de presentar los mismos supercomplejos, estos no presentaron la misma actividad, como se muestra en la *tabla 9*.

*Tabla 9. Diferencia entre los complejos detectados por actividad en gel en mitocondrias extraídas de pulmón*

Estequiometría tentativa	Masa calculada (KDa)	Complejos detectados por Actividad en gel <sup>(a)</sup>	Complejos detectados por Actividad en gel <sup>(b)</sup>
$I_1 + III_2 + IV_2$	1870	I + III + IV	III + IV
$I_1 + IV_2$	1390	I + IV	I
$I_1 + III_1 + IV_1$	1435	I + IV	I
$I_1 + IV_1$	1195	I + IV	I + IV
$I_1 + III_1$	1240	I + IV	I + IV
$V_1$	720	V	V
$III_1$ $IV_1$	240	III + IV	IV
$IV_1$	195	IV	IV
II	125*	II	II

a) Mitocondrias extraídas de pulmón de rata.

b) Mitocondrias extraídas de pulmón de rata tratadas con  $1\mu\text{g TiO}_2/\text{mg}$  proteína durante 30 minutos.

Se conoce que las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  inducen la formación de ROS y la lipoperoxidación, como respuesta a las interacciones nano-bio (Nel et al., 2009), siendo la cardiolipina un lípido particularmente susceptible a la peroxidación debido a la alta cantidad de dobles enlaces en su estructura. Éste es un lípido muy importante para la organización y función de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias ya que de éste dependen los complejos I, III y IV (Fry and Green, 1981). Se ha comprobado que la lipoperoxidación de la cardiolipina por medio de ROS afecta la actividad del complejo I (Paradies et al., 2004) y III (Petrosillo et al., 2003), lo que coincide con los datos de las actividades, donde la presencia de  $\text{TiO}_2$  afecta la actividad del complejo I, y un incremento en su concentración, afecta la actividad del complejo III.

## 7. Conclusión

- La medición de la actividad *in vitro* de los cuatro complejos respiratorios de mitocondrias extraídas de pulmón, una vez expuestas a los diferentes tratamientos de  $\text{TiO}_2$  y ante un reto oxidante, en presencia y ausencia de SOD y Catalasa permite generar información sobre el efecto que tienen los tratamientos en la actividad de los distintos complejos mitocondriales.

- o La actividad del complejo I solo se vio afectada directamente por la presencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- o El complejo II generó ROS en presencia de los tratamientos con TiO<sub>2</sub>. Esto incrementó la desviación en las lecturas de actividad.
- o En presencia de los tratamientos con TiO<sub>2</sub>, la actividad del complejo III se vio disminuida debido a la formación de ROS (quien oxidaba el sustrato).
- o La diferencia entre las actividades del complejo IV con y sin SOD y Catalasa indicó la formación de radicales libres causados por la presencia de los tres distintos tratamientos.
- Se pudo evaluar el efecto que causa el TiO<sub>2</sub> sobre la asociación supra molecular de los complejos respiratorios.
  - o Las mitocondrias extraídas de pulmón de rata, podrían poseer algunos de los siguientes supercomplejos no reportados aun: I<sub>1</sub>+IV<sub>2</sub>, I<sub>1</sub>+III<sub>1</sub>+IV<sub>1</sub>, I<sub>1</sub>+III<sub>1</sub>; en base a las actividades en gel y cálculos estequiométricos del presente trabajo.
  - o En el presente trabajo, se apreció que las mitocondrias tratadas con las concentraciones de 0.1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína, 0.5µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína y 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína, poseen tentativamente un dímero del complejo III, el cual ha sufrido pérdida de subunidades.
  - o El daño generado por concentraciones desde 0.1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína en el complejo I, se presentó como pérdida de actividad en gel hrCNE.
  - o El daño generado por NP TiO<sub>2</sub> en el complejo III mitocondrial es acumulativo, aumentando el daño conforme aumenta la concentración de TiO<sub>2</sub>.
  - o El daño generado por 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína en el complejo IV disminuye su actividad en gel solo en algunas bandas.
  - o No se encontraron diferencias entre la composición proteica de las bandas 1D de mitocondrias extraídas de pulmón control y tratadas con 1µg TiO<sub>2</sub>/mg proteína durante 30 minutos.

## 8. Literatura Citada

Acín-Pérez, R., Bayona-Bafaluy, M. P. M. P., Fernández-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Pérez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C. T., et al. (2004). Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Molecular cell*, 13(6), 805–15. Doi:10.1016/S1097-2765(04)00124-8

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (1997). *TOXICOLOGICAL PROFILE FOR TITANIUM TETRACHLORIDE* (p. 145). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (1997). *TOXICOLOGICAL PROFILE FOR TITANIUM TETRACHLORIDE* (p. 145). Retrieved from <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp101.pdf>. Retrieved from <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp101.pdf>

Althoff, T., Mills, D. J., Popot, J.-L., & Kühlbrandt, W. (2011). Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I1III2IV1. *The EMBO Journal*, 30(22), 4652–64. Doi:10.1038/emboj.2011.324

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2006). *Biochemistry. Good, Hardcover*, (p. 1021).

Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R. P., Hoffmann, E., & Dopp, E. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Particle and fibre toxicology*, 6, 17. Doi:10.1186/1743-8977-6-17

Bogdanov, M., Mileykovskaya, E., & Dowhan, W. (2008). Lipids in the assembly of membrane proteins and organization of protein supercomplexes: implications for lipid-linked disorders. *Sub-cellular biochemistry*, 49, 197–239. Doi:10.1007/978-1-4020-8831-5\_8

Brandt, U. (2006). Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annual review of biochemistry*, 75, 69–92. Doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142539

Buchanan, S. K., & Walker, J. E. (1996). Large-scale chromatographic purification of F1F0-atpase and complex I from bovine heart mitochondria. *Biochemical Journal*, 318 ( Pt 1, 343–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1217627/>

Buqué, X., Aspichueta, P., & Ochoa, B. (2008). Fundamento molecular de la esteatosis hepática asociada a la obesidad. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 100(9), 565–578. Doi:10.4321/S1130-01082008000900007

Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20419892>

Bénit, P., Goncalves, S., Philippe Dassa, E., Brière, J.-J., Martin, G., & Rustin, P. (2006). Three spectrophotometric assays for the measurement of the five respiratory chain complexes in minuscule biological samples. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 374(1-2), 81–6. Doi:10.1016/j.cca.2006.05.034

Card, J. W., Zeldin, D. C., Bonner, J. C., & Nestmann, E. R. (2008). Pulmonary applications and toxicity of engineered nanoparticles. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 295(3), L400–11. Doi:10.1152/ajplung.00041.2008

CHAPPELL, J. B., & PERRY, S. V. (1954). Biochemical and osmotic properties of skeletal muscle mitochondria. *Nature*, 173(4414), 1094–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13165721>

Chauveau, M., & Roussaux, J. (1996). EPR Studies on 6-Benzoylaminopurine and Thenoyltrifluoroacetone Inhibition Sites of Succinate Dehydrogenase in Plant Mitochondria. *Plant and Cell Physiology*, 37(7), 914–921. Doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029039

Chen, H.-W., Su, S.-F., Chien, C.-T., Lin, W.-H., Yu, S.-L., Chou, C.-C., Chen, J. J. W., et al. (2006). Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(13), 2393–5. Doi:10.1096/fj.06-6485fj

Comisión de las Comunidades Europeas. (2004). Comunicación de la comisión. Hacia una estrategia europea para las nanotecnologías.

Corneanu, G., & Craciun, C. (2010). THE EUKARYOTE CELL INTERACTION WITH DOPED tio<sub>2</sub> NANOPARTICLES. *Romnet.net*. Retrieved from [http://www.romnet.net/ro/seminar16martie2010/lucrari\\_extenso/Nano\\_2010\[1\]\\_corneanu.pdf](http://www.romnet.net/ro/seminar16martie2010/lucrari_extenso/Nano_2010[1]_corneanu.pdf)

Dabbeni-sala, F., Rai, A. K., & Lippe, G. (2011). F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP Synthase: A Fascinating Challenge for Proteomics. *Proteomics-Human diseases and Protein Functions* (Vol. 1, pp. 161–188).

Domínguez Ramírez, L., & Tuena de Gómez Puyou, M. (2005). La F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> atpsintasa: un complejo proteico con gran versatilidad estructural y funcional. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 8, 18–27.

Donaldson, K., Stone, V., Clouter, A., Renwick, L., & macnee, W. (2001). Ultrafine particles. *Occupational and environmental medicine*, 58(3), 211–6, 199. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?Artid=1740105&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Dudkina, N. V., Kouril, R., Peters, K., Braun, H.-P., & Boekema, E. J. (2010). Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochimica et biophysica acta*, 1797(6-7), 664–70. Doi:10.1016/j.bbabbio.2009.12.013

Dudkina, N. V., Sunderhaus, S., Boekema, E. J., & Braun, H.-P. (2008). The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 40(5), 419–24. Doi:10.1007/s10863-008-9167-5

Eble, K. S., Coleman, W. B., Hantgan, R. R., & Cunningham, C. C. (1990). Tightly associated cardiolipin in the bovine heart mitochondrial ATP synthase as analyzed by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *The Journal of biological chemistry*, 265(32), 19434–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2147180>

Fato, R., Bergamini, C., Bortolus, M., Maniero, A. L., Leoni, S., Ohnishi, T., & Lenaz, G. (2009). Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochimica et biophysica acta*, 1787(5), 384–92. Doi:10.1016/j.bbabbio.2008.11.003

Fleischer, S., Rouser, G., Fleischer, B., Casu, a, & Kritchevsky, G. (1967). Lipid composition of mitochondria from bovine heart, liver, and kidney. *Journal of lipid research*, 8(3), 170–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4292227>

Freyre-Fonseca, V., Delgado-Buenrostro, N. L., Gutiérrez-Cirlos, E. B., Calderón-Torres, C. M., Cabellos-Avelar, T., Sánchez-Pérez, Y., Pinzón, E., et al. (2011). Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function. *Toxicology letters*, 202(2), 111–9. Doi:10.1016/j.toxlet.2011.01.025

Fujishima, A., Rao, T., & Tryk, D. (2000). Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology ...*, 1(March), 1–21. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389556700000022>

Gohil, V. M., Hayes, P., Matsuyama, S., Schägger, H., Schlame, M., & Greenberg, M. L. (2004). Cardiolipin biosynthesis and mitochondrial respiratory chain function are interdependent. *The Journal of biological chemistry*, 279(41), 42612–8. Doi:10.1074/jbc.M402545200

Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W., & Nowack, B. (2009). Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (tio<sub>2</sub>, zno, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environmental science & technology*, 43(24), 9216–22. Doi:10.1021/es9015553

Grassian, V. H., o'shaughnessy, P. T., Adamcakova-Dodd, A., Pettibone, J. M., & Thorne, P. S. (2007). Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environmental health perspectives*, 115(3), 397–402. Doi:10.1289/ehp.9469

Hamilton, R. F., Wu, N., Porter, D., Buford, M., Wolfarth, M., & Holian, A. (2009). Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Particle and fibre toxicology*, 6, 35. Doi:10.1186/1743-8977-6-35

Harishchandra, R. K., Saleem, M., & Galla, H.-J. (2010). Nanoparticle interaction with model lung surfactant monolayers. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 7 Suppl 1, S15–26. Doi:10.1098/rsif.2009.0329.focus

Hederstedt, L. (2003). Structural biology. Complex II is complex too. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5607), 671–2. Doi:10.1126/science.1081821

Johnston, H. J., Hutchison, G. R., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S., & Stone, V. (2009). Identification of the mechanisms that drive the toxicity of tio(2 )particulates: the contribution of physicochemical characteristics. *Particle and fibre toxicology*, 6, 33. Doi:10.1186/1743-8977-6-33

Kaye, G. I., Mazurkiewicz, J. E., & Henrikson, R. C. (1997). NMS Histology. *Williams & Wilkins*. Retrieved January 7, 2013, from [http://books.google.com.mx/books/about/NMS\\_Histology\\_3e.html?id=2i\\_tocbit8uc&redir\\_esc=y](http://books.google.com.mx/books/about/NMS_Histology_3e.html?id=2i_tocbit8uc&redir_esc=y)

Knaapen, A. M., Borm, P. J. A., Albrecht, C., & Schins, R. P. F. (2004). Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 109(6), 799–809. Doi:10.1002/ijc.11708

Kobayashi, N., Naya, M., Endoh, S., Maru, J., Yamamoto, K., & Nakanishi, J. (2009). Comparative pulmonary toxicity study of nano-tio(2) particles of different sizes and agglomerations in rats: different short- and long-term post-instillation results. *Toxicology*, 264(1-2), 110–8. Doi:10.1016/j.tox.2009.08.002

Lenaz, G., Fato, R., Genova, M. L., Formiggini, G., Parenti Castelli, G., & Bovina, C. (1995). Underevaluation of complex I activity by the direct assay of NADH-coenzyme Q reductase in rat liver mitochondria. *FEBS letters*, 366(2-3), 119–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7789527>

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., et al. (2007). *Molecular Cell Biology* (p. 973). W. H. Freeman.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>

Luna-López, A. (2008). EL FANTÁSTICO MUNDO DE LA PROTEÍNA Bcl-2. *Revista de ...*, 27, 93–102. Retrieved from <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/forazardescargaarchivo.jsp?Cvrev=490&cvart=49011480004&nombre=EL FANTÁSTICO MUNDO DE LA PROTEÍNA Bcl-2>

Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L., & Tolbert, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical biochemistry*, 87(1), 206–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/98070>

Mathews, C. K., Ahern, K. G., & Holde, K. E. Van. (2002). *Bioquímica* (p. 1335). Retrieved from <http://books.google.com.mx/books/about/Bioquímica.html?id=yclxhensfa8c>

- MATSUBARA, T., & TOCHINO, Y. (1971). Electron Transport Systems of Lung Microsomes and Their Physiological Functions: I. Intracellular Distribution of Oxidative Enzymes in Lung Cells. *Journal of biochemistry*, 991, 981–991. Retrieved from <http://jcb.oxfordjournals.org/content/70/6/981.short>
- Maynard, A. D., Aitken, R. J., Butz, T., Colvin, V., Donaldson, K., Oberdörster, G., Philbert, M. A., et al. (2006). Safe handling of nanotechnology. *Nature*, 444(7117), 267–9. Doi:10.1038/444267a
- Mckenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D. R., & Ryan, M. T. (2006). Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients. *Journal of molecular biology*, 361(3), 462–9. Doi:10.1016/j.jmb.2006.06.057
- Melo Ruiz, V., & Cuamatzi Tapia, O.-. (2007). *Bioquímica Procesos Metabólicos* (p. 390).
- Muller, F. L., Roberts, A. G., Bowman, M. K., & Kramer, D. M. (2003). Architecture of the Qo site of the cytochrome bc1 complex probed by superoxide production. *Biochemistry*, 42(21), 6493–9. Doi:10.1021/bi0342160
- National Institute for Occupational Safety and Health. (2005). *NIOSH Current Intelligence Bulletin: Evaluation of Health Hazard and Recommendations for Occupational Exposure to Titanium Dioxide. Draft* (p. 158). Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnq=Search&q=intitle:NIOSH+CURRENT+INTELLIGENCE+BULLETIN+:+E+valuation+of+Health+Hazard+and+Recommendations+for+Occupational+Exposure+to+Titanium+Dioxide#0>
- Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M. V., Somasundaran, P., Klaessig, F., et al. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials*, 8(7), 543–57. Doi:10.1038/nmat2442
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*, 113(7), 823–39. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?Artid=1257642&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Paddenberg, R., Ishaq, B., Goldenberg, A., Faulhammer, P., Rose, F., Weissmann, N., Braun-Dullaeus, R. C., et al. (2003). Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 284(5), L710–9. Doi:10.1152/ajplung.00149.2002
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Federici, A., & Ruggiero, F. M. (2004). Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circulation research*, 94(1), 53–9. Doi:10.1161/01.RES.0000109416.56608.64
- Park, E.-J., Yi, J., Chung, K.-H., Ryu, D.-Y., Choi, J., & Park, K. (2008). Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology letters*, 180(3), 222–9. Doi:10.1016/j.toxlet.2008.06.869
- Pestronk, A. (2012). Mitochondrial Disorders. 12/22/2011. Retrieved January 7, 2013, from <http://neuromuscular.wustl.edu/mitosyn.html#mitogen>
- Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R. A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M. L., & Schägger, H. (2003). Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *The Journal of biological chemistry*, 278(52), 52873–80. Doi:10.1074/jbc.M308366200
- Plattner, H., & Hentschel, J. (2001). *Manual de biología celular. OMEGA* (p. 480). Retrieved from [http://books.google.com.mx/books/about/Manual\\_de\\_biología\\_celular.html?Id=jyqnpqaacaj&redir\\_esc=y](http://books.google.com.mx/books/about/Manual_de_biología_celular.html?Id=jyqnpqaacaj&redir_esc=y)

Robichaud, C. O., Uyar, A. E., Darby, M. R., Zucker, L. G., & Wiesner, M. R. (2009). Estimates of upper bounds and trends in nano-tio<sub>2</sub> production as a basis for exposure assessment. *Environmental science & technology*, 43(12), 4227–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19603627>

Sager, T. M., & Castranova, V. (2009). Surface area of particle administered versus mass in determining the pulmonary toxicity of ultrafine and fine carbon black: comparison to ultrafine titanium dioxide. *Particle and fibre toxicology*, 6, 15. Doi:10.1186/1743-8977-6-15

Scheffler, I. E. (2011). *Mitochondria* (p. 472). John Wiley & Sons. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=awraafdard8c&pgis=1>

Scheffler, I. E., & Allison, W. S. (2009). Mitochondrial Function: Mitochondrial electron transport complexes and reactive oxygen species. *Academic Press*. Retrieved January 7, 2013, from [http://books.google.com.mx/books/about/Mitochondrial\\_Function\\_Part\\_A.html?id=oztztaluoasc&redir\\_esc=y](http://books.google.com.mx/books/about/Mitochondrial_Function_Part_A.html?id=oztztaluoasc&redir_esc=y)

Schmid, G. (2011). *Nanoparticles: From Theory to Application* (p. 500). John Wiley & Sons. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=u25c9bh8gi4c&pgis=1>

Schägger, H. (2001). Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB life*, 52(3-5), 119–28. Doi:10.1080/15216540152845911

Schägger, H., & Pfeiffer, K. (2001). The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *The Journal of biological chemistry*, 276(41), 37861–7. Doi:10.1074/jbc.M106474200

Schägger, Hermann. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols*, 1(1), 16–22. Doi:10.1038/nprot.2006.4

Schägger, Hermann, De Coo, R., Bauer, M. F., Hofmann, S., Godinot, C., & Brandt, U. (2004). Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *The Journal of biological chemistry*, 279(35), 36349–53. Doi:10.1074/jbc.M404033200

Shukla, R. K., Sharma, V., Pandey, A. K., Singh, S., Sultana, S., & Dhawan, A. (2011). ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 25(1), 231–41. Doi:10.1016/j.tiv.2010.11.008

Slater, E. C. (1967). Oxidation and Phosphorylation. *Methods in enzymology*, 10, 48–57. Doi:10.1016/0076-6879(67)10011-6

Smits, P., Smeitink, J., & Van den Heuvel, L. (2010). Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, 737385. Doi:10.1155/2010/737385

Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B., & Schägger, H. (2004). Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *The Journal of biological chemistry*, 279(6), 5000–7. Doi:10.1074/jbc.M309505200

Tran, L. (2009). Las NA y la salud. La nanotecnología y la evaluación del riesgo de las nanopartículas artificiales (ERNA). *Seguridad y Medio Ambiente*, 114, 6–16.

- Trumpower, B. L. (1990). Cytochrome bc1 complexes of microorganisms. *Microbiological reviews*, 54(2), 101–29. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?Artid=372766&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tsalouhidou, S., Argyrou, C., Theofilidis, G., Karaoglanidis, D., Orfanidou, E., Nikolaidis, M. G., Petridou, a, et al. (2006). Mitochondrial phospholipids of rat skeletal muscle are less polyunsaturated than whole tissue phospholipids: implications for protection against oxidative stress. *Journal of animal science*, 84(10), 2818–25. Doi:10.2527/jas.2006-031
- Van Meer, G., Voelker, D. R. D., Feigenson, G. W. G., & Meer, G. Van. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews molecular ...*, 9(2), 112–124. Doi:10.1038/nrm2330.Membrane
- Vedel, F., Vedel, F., Lalanne, E., Sabar, M., Chetrit, P., & De Paepe, R. The mitochondrial respiratory chain and ATP synthase complexes: Composition, structure and mutational studies. , 37 *Plant Physiology and Biochemistry* 629 – 643 (1999). Retrieved from [http://journals.ohiolink.edu/ejc/article.cgi?Issn=09819428&issue=v37i0009&article=629\\_tmrcacccsams](http://journals.ohiolink.edu/ejc/article.cgi?Issn=09819428&issue=v37i0009&article=629_tmrcacccsams)
- Viola, H. M., & Hool, L. C. (2010). Qo site of mitochondrial complex III is the source of increased superoxide after transient exposure to hydrogen peroxide. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 49(5), 875–85. Doi:10.1016/j.yjmcc.2010.07.015
- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5407), 1482–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066162>
- Wittig, I., Karas, M., & Schägger, H. (2007). High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 6(7), 1215–25. Doi:10.1074/mcp.M700076-MCP200
- Xia, T., Kovochich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., et al. (2006). Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano letters*, 6(8), 1794–807. Doi:10.1021/nl061025k
- Zerbetto, E., Vergani, L., & Dabbeni-Sala, F. (1997). Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 18(11), 2059–64. Doi:10.1002/elps.1150181131
- Zhang, M., Mileykovskaya, E., & Dowhan, W. (2005). Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 280(33), 29403–8. Doi:10.1074/jbc.M504955200