



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO
ASOCIADO A LA EXPOSICIÓN *IN VITRO* DE
SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS
PREPARADAS A BASE DE DIÓXIDO DE SILICIO
(SiO₂), POLIETILCIANOACRILATO (PECA) Y
QUITOSÁN-GSH SOBRE LA FUNCIÓN
PROTEOSOMAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

LAURA DENISE LÓPEZ BARRERA

ASESORA:

DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación del efecto tóxico asociado a la exposición "in vitro" de sistemas de nanopartículas preparadas a base de dióxido de silicio (SiO₂), Polietilenoacrilato (PECA) y Quitosán- GSH sobre la función proteosomal

Que presenta la pasante: Laura Denise López Barrera

Con número de cuenta: 410031029 para obtener el Título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de noviembre de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. J. Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	QFB. Gabriela Escalante Reynoso	
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
1er. SUPLENTE	QFB. Azucena Lee Mendoza	
2do. SUPLENTE	Dra. Dolores Molina Jasso	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/iac

DEDICATORIA

A mi Mamá

Por ser un ejemplo a seguir, apoyarme, cuidarme y guiarme en el camino

A mi Papá

Por mostrarme que siempre se puede ser mejor y que puedo alcanzar cualquier objetivo que me proponga

A mi hermana Mari

Por estar siempre a mi lado apoyándome y acompañándome en todo momento

A mi hermana Adriana

Que me ha cuidado y aconsejado a lo largo de mi vida

A Hugo

Mi compañero y amigo desde hace muchos años, que ha estado a mi lado, sin importar las consecuencias

Y por último a Laura Denise

Por qué a pesar de todas las dificultades que se presentaron a lo largo de mi formación profesional, conseguí alcanzar uno de mis mayores anhelos.

Gracias a todos...

*"En este lugar no perdemos demasiado tiempo mirando hacia atrás.
Camina hacia el futuro. Abriendo nuevas puertas y probando cosas nuevas.
Se curioso... porque nuestra curiosidad siempre nos conduce por nuevos caminos."*

Walt Disney

AGRADECIMIENTO

A la Dr. Patricia Ramírez Noguera que me acepto como su estudiante de tesis, por la paciencia que siempre mostro y los consejos que me dio, además de alentarme a ser optimista y confiar en mis capacidades. Por todo el apoyo brindado dentro y fuera del laboratorio y por las oportunidades otorgadas para poder concluir este proyecto.

Al Dr. Roberto Díaz, que me ayudo y oriento, siendo parte fundamental para todos los experimentos realizados a lo largo de la presente tesis, por todas sus aportaciones y enseñanzas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán que me acogieron en sus aulas y me enseñaron que no todo se aprende en los libros y me dieron las bases para seguir adelante.

Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida, ya que esta investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, clave IN220612, mediante el proyecto "Nanotoxicología: Estudio de la capacidad citotóxica y genotóxica de nanopartículas fabricadas con polietilenoacrilato y quitosán".

Í N D I C E

ABREVIATURAS.....	VII
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Historia del Sistema Ubiquitina-Proteosoma.....	3
2.2. Mecanismos de degradación de proteínas.....	4
2.2.1. Sistema lisosómico.....	4
2.2.2. Sistema Ubiquitina-Proteosoma.....	5
2.3. El proteosoma.....	7
2.3.1. Generalidades.....	7
2.3.2. El núcleo.....	7
2.3.3. Proteínas reguladoras 19S.....	8
2.3.4. Otros tipos de proteosomas.....	9
2.4. Ubiquitina.....	10
2.4.1. Generalidades.....	10
2.4.2. Función.....	11
2.5. Enzimas deubiquitinizantes.....	13
2.5.1. Generalidades.....	13
2.5.2. Funciones.....	13
2.5.2.1. Características estructurales de la familia de las enzimas UCH.....	15
2.5.2.2. Características estructurales de la familia de las enzimas USP/UBP.....	15
2.5.2.3. Características estructurales de la familia de las enzimas OTU.....	16
2.5.2.4. Características estructurales de la familia de las enzimas Josephin.....	16
2.5.2.5. Características estructurales de la familia de las enzimas JAMM/MPN.....	16
2.6. Inhibidores del proteosoma.....	17
2.6.1. Características.....	17
2.6.2. Clasificación.....	17
2.6.3. Inhibidor MG132.....	18
2.7. Estrés oxidativo y el proteosoma.....	19
2.7.1. Formación de radicales libres.....	21
2.7.2. Mecanismos antioxidantes de la célula.....	22
2.8. Nanopartículas.....	24
2.8.1. Historia.....	24
2.8.2. Definición.....	25
2.8.3. Métodos de preparación.....	26
2.8.3.1. Dispersión de polímeros preformados.....	26
2.8.3.2. Método de polimerización interfacial.....	28

2.8.3.3.	<i>Gelificación iónica o coacervación de polímeros hidrofílicos.....</i>	28
2.8.4.	<i>Caracterización.....</i>	29
2.8.4.1.	<i>Tamaño de partícula.....</i>	29
2.8.4.2.	<i>Dispersión de luz dinámica y difracción laser.....</i>	30
2.8.4.3.	<i>Potencial zeta (Z).....</i>	30
2.8.4.4.	<i>Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....</i>	31
2.8.4.5.	<i>Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....</i>	31
2.8.5.	<i>Nanopartículas de PECA.....</i>	32
2.8.6.	<i>Nanopartículas de SiO₂.....</i>	33
2.8.7.	<i>Nanopartículas de Quitosán-GSH.....</i>	33
2.8.8.	<i>Antecedentes de las nanopartículas utilizadas.....</i>	34
3.	JUSTIFICACIÓN.....	38
4.	OBJETIVOS.....	38
4.1	Objetivo General.....	38
4.2	Objetivos Particulares.....	38
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
5.1.	Reactivos y soluciones.....	39
5.1.1.	<i>Cultivo celular.....</i>	39
5.1.2.	<i>Controles y sistemas de nanopartículas.....</i>	39
5.1.3.	<i>Cosecha de células.....</i>	40
5.1.4.	<i>Cuantificación de proteínas totales.....</i>	40
5.1.5.	<i>Determinación de la actividad proteosomal similar a quimotripsina.....</i>	40
5.1.6.	<i>Evaluación de la actividad de enzimas deubiquitinizantes.....</i>	40
5.2.	Aparatos y Equipos.....	41
5.3.	Metodología.....	41
5.3.1.	<i>Mantenimiento del cultivo celular.....</i>	41
5.3.2.	<i>Exposición a las nanopartículas.....</i>	42
5.3.3.	<i>Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.....</i>	43
5.3.4.	<i>Determinación de la actividad proteosomal similar a quimotripsina.....</i>	44
5.3.5.	<i>Determinación de la actividad de enzimas deubiquitinizantes.....</i>	44
6.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	45
7.	CONCLUSIONES.....	57
8.	PERSPECTIVAS.....	58
9.	REFERENCIAS.....	60

A B R E V I A T U R A S

- µl: Microlitro
- AML-12: Alpha mouse liver 12 (hígado de ratón alfa)
- BSA: Albumina Sérica Bovina
- BSO: Buthionine-S, R- sulfoximine
- cTEC: Células epiteliales corticales del timo
- DMSO: Dimetil Sulfoxido
- DUBs: enzimas deubiquitinizantes
- eq: Equivalente
- ERAD: Degradación asociada a retículo endoplasmico
- GSH: Glutación
- HaCat: Línea celular derivada de queratinocitos humanos
- M: Molaridad
- MCH-I: Molécula de Histocompatibilidad Clase I
- nM: Nanomolar
- nm: Nanometros
- NP: Nanopartícula
- PACA: Poliacilcianoacrilato
- PBS: Buffer de fosfatos
- PCA: Poli- cianoacrilato
- PECA: Polietilcianoacrilato
- PLA: Poli ácido láctico
- PLG : Poli D-L- glicolido
- PLGA: Poli D-L-láctico-glicolido
- ROS: Especies reactivas de oxígeno
- rpm: Revoluciones por minuto
- Rpn: Regulatory particle of non-ATPase (Partícula regulatoria no ATPasa)
- Rpt: Regulatory particle of tripe-ATPase (Partícula regulatoria trifosfatasa)
- SEM: Scanning Electron Microscope (Microscopía Electrónica de Barrido)
- SFB: Suero Fetal Bovino
- SSF: Solución Salina Fisiológica
- TEM: Transmission Electron Microscopy (Microscopía Electrónica de Transmisión)
- UBL: Ubiquitin-like proteins (Proteínas similares a ubiquitina)
- UPS: Sistema Ubiquitina-Proteosoma

Í N D I C E D E G R Á F I C A S

- Gráfica.1 Comparación del porcentaje de actividad proteosomal similar a quimotripsina en células expuestas a diversos sistemas nanoparticulados preparados a base de PECA y SiO₂, el inhibidor del proteosoma MG 132 y el control (células no expuestas). Las barras marcadas (*) indican que hay diferencias significativas entre las medias correspondientes a $p < 0.05\%$46
- Gráfica.2 Análisis estadístico de comparación mediante la prueba de Tukey de la actividad proteosomal similar a quimotripsina en el que se muestran las diferencias estadísticas significativas entre las medias correspondientes $p < 0.05\%$ de los sistemas nanoparticulados preparados a base de PECA y SiO₂, el inhibidor del proteosoma MG 132 y el control (células no expuestas).....47
- Gráfica.3 Comparación del porcentaje de actividad de enzimas deubiquitinizantes en células expuestas a los sistemas nanoparticulados preparados a base de PECA y SiO₂, el inhibidor del proteosoma MG 132 y el control (células no expuestas). Las barras marcadas (*) indican que hay diferencias significativas entre las medias correspondientes a $p < 0.05\%$49
- Gráfico.4 Análisis estadístico de comparación mediante la prueba de Tukey de la actividad de enzimas deubiquitinizantes en el que se muestran las diferencias estadísticas significativas entre las medias correspondientes $p < 0.05\%$ de los sistemas nanoparticulados preparados a base de PECA y 2.1 PECA/SiO₂, el inhibidor del proteosoma MG 132 y el control (células no expuestas).....50
- Gráfica.5 Comparación del porcentaje de actividad proteosomal similar a quimotripsina de células expuestas a diversos sistemas nanoparticulados preparados a base de Quitosán-GSH (Quitosán-GSH.1 es la dosis alta y Quitosán-GSH.2 es la dosis baja), células expuestas a H₂O₂, el inhibidor del proteosoma MG 132 y el control (células no expuestas). Las barras marcadas (*) indican que hay diferencias significativas entre las medias correspondientes a $p < 0.05\%$51
- Gráfica.6 Análisis estadístico de comparación mediante la prueba de Tukey de la actividad proteosomal similar a quimotripsina en el que se muestran las diferencias estadísticas significativas entre las medias correspondientes $p < 0.05\%$ de los sistemas nanoparticulados preparados a base de Quitosán-GSH, el inhibidor del proteosoma MG 132, células expuestas a H₂O₂ y el control (células no expuestas).....52
- Gráfico.7 Comparación del porcentaje de actividad de enzimas deubiquitinizantes en células expuestas a sistemas nanoparticulados preparados a base de Quitosán-GSH, células expuestas a H₂O₂, el inhibidor del proteosoma MG 132 y el control

- (células no expuestas). Las barras marcadas (*) indican que hay diferencias significativas entre las medias correspondientes a $p < 0.05\%$55
- Gráfica.8 Análisis estadístico de comparación mediante la prueba de Tukey de la actividad de enzimas deubiquitinizantes en el que se muestran las diferencias estadísticas significativas entre las medias correspondientes $p < 0.05\%$ de los sistemas nanoparticulados preparados a base de Quitosán-GSH, el inhibidor del proteosoma MG 132, células expuestas a H₂O₂ y el control (células no expuestas).....56

Í N D I C E D E F I G U R A S

- Fig.1 Mecanismos de degradación de proteínas mediados por el sistema lisosómico.....4
- Fig.2 Mecanismo de degradación del Sistema Ubiquitina-Proteosoma.....6
- Fig.3 Estructura del proteosoma 26S con sus diferentes subunidades.....8
- Fig.4 Representación esquemática de diversos proteosomas. A la izquierda se encuentra el inmunoproteosoma el cual se expresa en respuesta al INF- γ , a la derecha el timoproteosoma el cual se encuentra específicamente en las cTECs y en el centro el proteosoma estándar.....10
- Fig.5 Algunas de las diferentes funciones de la ubiquitina y proteínas tipo ubiquitina. a) Sistema Ubiquitina-Proteosoma. b) Mono u oligoubiquitinas asociadas a la degradación lisosómica. c) Monoubiquitinas y d) Proteínas UBL para dirigir proteínas diana a su sitio de acción. e) Generación de cadenas de poliubiquitina para la activación de reguladores transcripcionales.....12
- Fig.6 Funciones de DUBs en la vía de ubiquitina. 1) Editan o rescatan ubiquitinas conjugadas. 2) Reciclaje de ubiquitina u oligómeros de ubiquitina antes de la degradación. 3) Desensamblaje de oligómeros de ubiquitina.....14
- Fig.7 Diferentes inhibidores covalentes del proteosoma.....18
- Fig.8 Estructura del inhibidor MG 132.....19
- Fig.9 Respuesta celular al estrés oxidativo. Se muestra como la producción de especies reactivas de oxígeno, resultan en una respuesta celular hasta llegar a un equilibrio (homeostasis).....20
- Fig. 10 Representación esquemática de la cadena respiratoria.....22
- Fig.11 Representación esquemática de nanocápsulas y nanoesferas. a) Fármaco disuelto en el núcleo de la nanocápsula. b) Fármaco absorbido en la pared

polimérica. c) Fármaco retenido en la matriz polimérica. d) Fármaco absorbido o disperso en la superficie	25
➤ Fig.12 Representación gráfica de la estructura de una nanoesfera y una nanocápsula.....	26
➤ Fig.13 Método de evaporación de solvente.....	27
➤ Fig.14 Método de Salting out.....	28
➤ Fig.15 Esquema de las principales diferencias entre el microscopio óptico, electrónico de transmisión y el de barrido	32
➤ Fig.16 Estructura química de la molécula de quitosán.....	34
➤ Fig.17 Resultados de las micrografías de TEM para los diferentes sistemas nanoparticulados. (A) PECA, (B) SiO ₂ /PECA, (C) 2.1 PECA/SiO ₂	36
➤ Fig.18 Resultados de las micrografías de SEM para los diferentes sistemas nanoparticulados. (A) SiO ₂ y (B) PECA/SiO ₂	37

Í N D I C E D E T A B L A S

➤ Tabla 1 Resumen de las especies reactivas ordenadas según crece su actividad....	21
➤ Tabla 2 Métodos de caracterización de nanopartículas.....	29
➤ Tabla 3 Valores asociados a la estabilidad de las partículas en función al potencial Z.....	30
➤ Tabla 4 Caracterización de los sistemas nanoparticulados preparados a base de PECA y SiO ₂	35
➤ Tabla 5 Caracterización de los sistemas nanoparticulados preparados a base de Quitosán-GSH.....	36
➤ Tabla 6 Concentraciones de las nanopartículas de PECA y SiO ₂ agregadas a los cultivos celulares.....	42
➤ Tabla 7 Concentraciones de las nanopartículas de Quitosán-GSH agregadas a los cultivos celulares.....	42
➤ Tabla 8 Volúmenes requeridos de BSA y PBS para la preparación de la curva estándar de proteínas totales por el método de Bradford.....	43

1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología ha tenido un gran desarrollo en los últimos años principalmente su aplicación en la farmacología mediante la producción de nanopartículas como vectores de fármacos o como estructuras moduladoras de señales celulares blanco. Las nanopartículas se definen como sistemas sólidos coloidales formados de materiales macromoleculares, que se encuentran en un rango de tamaño 10 hasta 1000 nm (Kreuter, 2007). El uso de las nanopartículas como vehículos para medicamentos es muy prometedor ya que en algunos casos muestran especificidad y se requiere en general de una menor dosis para que se lleve a cabo un efecto terapéutico.

Sin embargo al ser sustancias externas al organismo cabe la posibilidad de que produzcan diversos efectos biológicos, como inhibir o estimular la síntesis o degradación de diversas macromoléculas, o tener un efecto tóxico en algunas células. Para evaluar el efecto tóxico asociado a la exposición *in vitro*, se puede utilizar cultivos celulares primarios o transformados, lo cual implica el aislamiento o la dispersión de células de órganos y tejidos así como su mantenimiento y exposición a los xenobióticos en estudio (Curtis, 2006).

En este trabajo se evaluará el efecto que pudieran tener los sistemas nanoparticulados fabricados a base de dióxido de silicio (SiO₂), Polietilenoacrilato (PECA) y Quitosán-GSH en la actividad del proteosoma utilizando como modelo experimental la línea celular AML-12 proveniente de hígado de ratón. Además de estudiar la modulación de la respuesta óxido-reductora que las nanopartículas de Quitosán-GSH pudieran llegar a producir en las células al momento de su exposición, al contener glutatión y ser éste un antioxidante endógeno producido por las células que participa directamente en la neutralización de radicales libres y compuestos reactivos de oxígeno.

El Sistema Ubiquitina-Proteosoma, es un sistema de procesamiento proteico intracelular muy importante en los organismos. Es un complejo proteico multicatalítico y con actividades endoproteolíticas que hidroliza de forma rápida y selectiva aquellas proteínas marcadas con moléculas de ubiquitina (Tanaka, 2009).

Para que el proceso de ubiquitinización se lleve a cabo la ubiquitina necesita estar en contacto con una enzima E1 dependiente de ATP y de esta forma se activa y se une a una enzima E2 y ésta a su vez, interactúa con una E3 que identifica a la proteína blanco. Por último el complejo ubiquitina-proteína blanco es reconocida por el proteosoma en 26S y la proteína es degradada en aminoácidos (Tu, Chen, Pan, Xu, Zhou, & Wang, 2012).

A su vez este proceso puede ser reversible por acción de las enzimas deubiquitinizantes las cuales se unen a moléculas de ubiquitina impidiendo su función (Komander, Clague, Urbe, & Sylvie, 2009). Por lo tanto una modificación en el correcto funcionamiento de estas proteínas puede producir que algunos sustratos no sean procesados correctamente o bien que su actividad se vea incrementada o disminuida en su capacidad de degradación, lo que afecta los procesos biológicos que son regulados mediante este sistema (Castro, 2008).

2. MARCO TEORICO

2.1 Historia del Sistema Ubiquitina-Proteosoma

A mitad de 1950 Christian de Duve descubrió el lisosoma, el cual se creía era un organelo sin el cual las proteínas no podían ser degradadas. Este descubrimiento así como otros experimentos independientes demostraron que las proteínas se encontraban en un estado constante de síntesis y degradación. Sin embargo por más de dos décadas (1950-1970) se volvió más difícil explicar los mecanismos de degradación intracelular de las proteínas basándose solamente en los mecanismos de la actividad lisosomal ya que había evidencia de que la degradación de algunas proteínas no podía llevarse a cabo mediante este sistema (Ciechanover, 2005).

El descubrimiento del estado dinámico de las proteínas, fue la base de diversos experimentos que culminaron en la idea de que la degradación intracelular de las proteínas debía de llevarse a cabo bajo condiciones metabólicas basales, lo que dio pie al descubrimiento del Sistema Ubiquitina-Proteosoma. El proteosoma 26S fue observado y aislado por primera vez a partir de reticulocitos en el año de 1978, denominándolo cilindro debido a la forma alargada que presentaba este complejo proteico (Ciechanover, 2009).

A finales de 1970 y cerca de 1980 Aaron Ciechanover, Avram Hershko e Irvi Rose observaron que el sitio conservado 76 NH₂ de la ubiquitina servía como marcador en el proceso de degradación de las proteínas a nivel celular. Lo que permitió que para los años 90s ya se conocieran las funciones básicas de la ubiquitina y a mediados de esta década mediante cristalografía de rayos X se observara por primera vez el núcleo del proteosoma (Ciechanover, 2010a).

En el año 2000 con el descubrimiento del genoma humano se reveló la existencia de cientos de distintos tipos de E3s, y con ella se comprobó la alta especificidad y selectividad de este sistema lo que dio pie al descubrimiento de proteínas reguladoras como la subunidad 19s y la 11s (Tanaka, 2009). Hoy en día los estudios están enfocados principalmente en evaluar el efecto de su inhibición o activación en su aplicación en áreas como la Medicina, Farmacología y Oncología por mencionar algunas.

2.2 Mecanismos de degradación de proteínas

2.2.1 Sistema lisosómico

Hasta el día de hoy se conocen dos mecanismos fundamentales para la degradación de proteínas; el sistema lisosómico y la vía de ubiquitina-proteosoma. El sistema lisosómico está constituido por el lisosoma, que es una estructura vacuolar que contiene alrededor de 50 enzimas hidrolíticas distintas. Este sistema puede degradar todo tipo de macromoléculas de manera no selectiva, como se muestra en la fig. 1 (Koolman & Klaus-Heirrich, 2005).

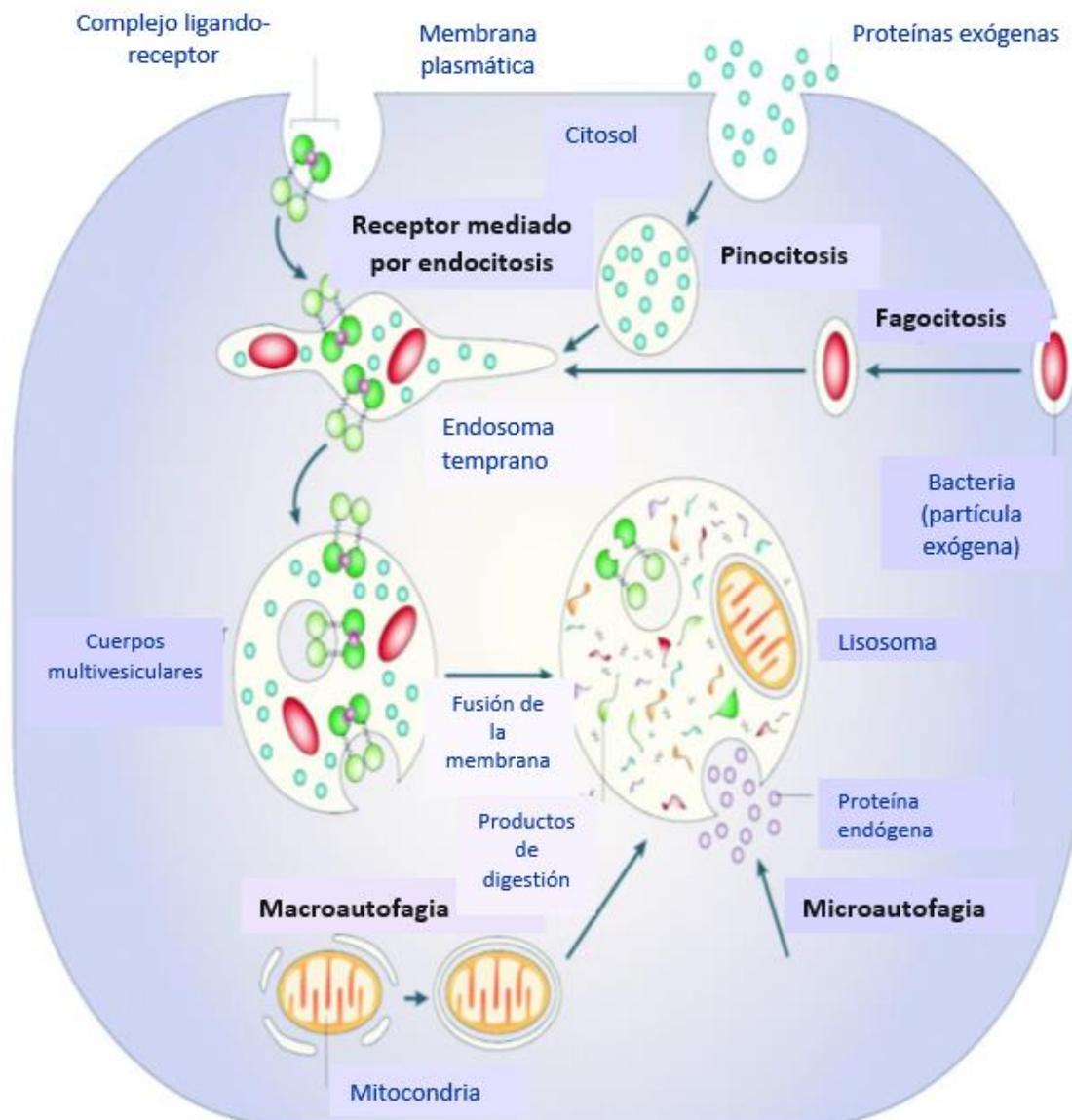


Fig. 1 Mecanismos de degradación de proteínas mediados por el sistema lisosómico (Ciechanover, 2010b)

Este sistema es dinámico e involucra la maduración del lisosoma, con el objetivo de degradar proteínas exógenas (pinocitosis y endocitosis) y partículas exógenas (fagocitosis), procesos conocidos como heterofagia (Ciechanover, 2010b). Por otro lado también se lleva a cabo la digestión de proteínas endógenas y organelos celulares (micro y macroautofagia) y dependiendo del proceso que se lleve a cabo vamos a tener:

- *Lisosomas primarios:* Se forman a partir del aparato de Golgi, contienen únicamente hidrolasas ácidas y tienen la propiedad de fusionarse con vesículas fagocíticas.
- *Lisosomas secundarios:* Resultado de la unión entre un lisosoma primario y una vesícula fagocítica.
- *Vesículas autofágicas:* Son las encargadas del recambio de proteínas y de organelos.
- *Fagolisosomas:* Contienen enzimas lisosomales y partículas ajenas a la célula que han sido capturadas por un proceso de fagocitosis.

Durante este proceso un organelo dañado o una pequeña cantidad de citosol es rodeado por una membrana, posteriormente un lisosoma se fusiona con esta vesícula y una vez unido el material encerrado es degradado al disminuir el pH y activarse las enzimas hidrolíticas, al final los cuerpos vesiculares contienen los restos no digeridos (Campbell & Reece, 2007).

2.2.2 Sistema Ubiquitina-Proteosoma

El Sistema Ubiquitina-Proteosoma es un sistema altamente conservado en células eucariotas, este mecanismo común de regulación intracelular se encarga entre otras cosas de la degradación no lisosómica de las proteínas anormales, dañadas, producidas por una lesión oxidativa o ubicadas incorrectamente (Yang & Zhang, 2010).

Es considerado un sistema multienzimático conformado por un grupo de proteínas activadoras (ubiquitinadoras y deubiquitinizantes) y ubiquitina, las cuales en conjunto y mediante una serie de reacciones enzimáticas en cadena marcan a las proteínas que van a ser degradadas, como se muestra en la fig 2. En este sistema el proteosoma desempeña una función importante; contiene un cilindro central formado a partir de proteasas cuyos sitios activos se localizan en una cámara interna, y por el que pasan las proteínas marcadas por ubiquitinas para su posterior degradación (Werner, 2006).

Entre las funciones del Sistema Ubiquitina-Proteosoma destacan:

- Control del ciclo celular
- Reparación del DNA
- Oncogénesis
- Catabolismo de proteínas anormales
- Modulación de la respuesta inmune e inflamatoria
- Modulación de receptores de superficie y canales iónicos
- Procesamiento de antígenos
- Biogénesis de los ribosomas
- Regulación de la transcripción
- Actúa en las infecciones víricas
- Degeneración neural y muscular
- Diferenciación celular
- Respuesta al estrés etc.

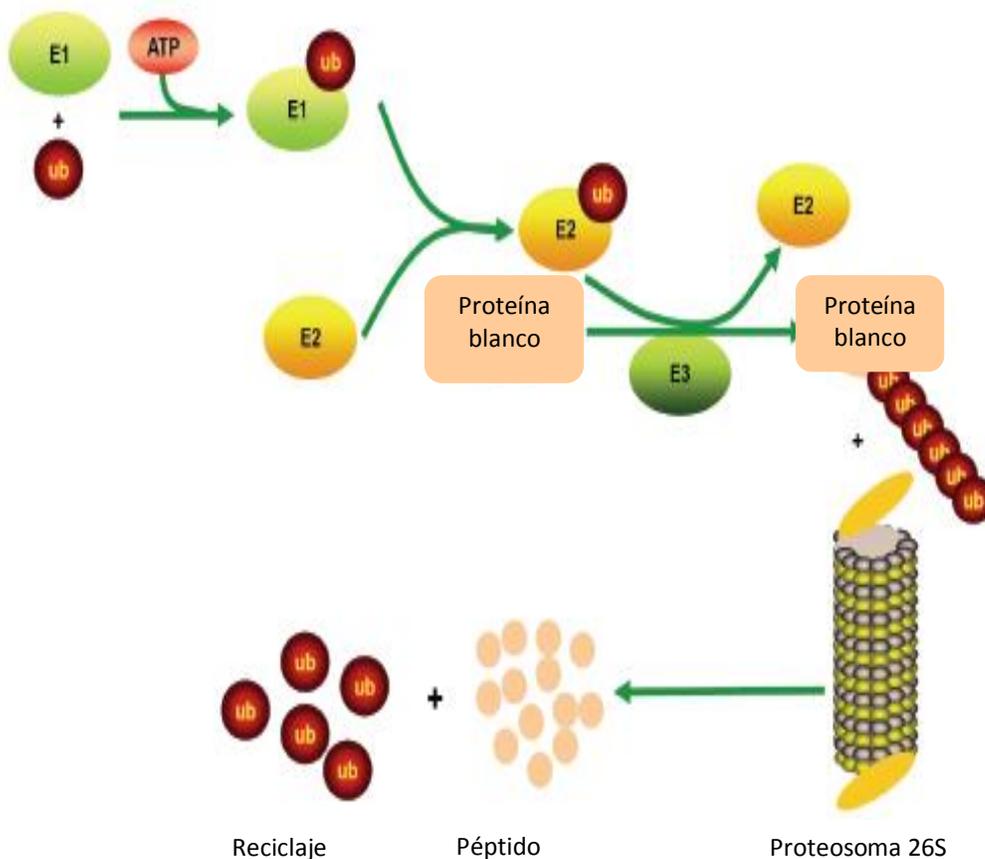


Fig. 2 Mecanismo de degradación del Sistema Ubiquitina-Proteosoma (Tu, Chen, Pan, Xu, Zhou, & Wang, 2012)

2.3 El proteosoma

2.3.1 Generalidades

Hay dos formas básicas conocidas del proteosoma: una ancestral que es encontrada en bacterias *Archaea* como *Thermoplasma acidophilum* y la forma altamente evolucionada que se puede encontrar en levaduras, plantas y animales. El proteosoma se puede encontrar tanto en el citosol como en compartimentos nucleares de la célula, incluso también puede encontrarse en el retículo endoplasmático o asociado al citoesqueleto (Grune, 2012).

El proteosoma 26S es un complejo proteico que está compuesto por proteasas nucleares y citosolicas (PM 2x10⁶Da). Se encuentra formado por un núcleo catalítico llamado subunidad 20S compuesto por 28 unidades agrupadas en cuatro cilindros apilados. Los sitios de entrada están formados por complejos de partículas 19S que controlan la entrada al núcleo, donde las moléculas marcadas con la proteína ubiquitina (ubiquitinadas) son reconocidas por estas subunidades, desdobladas con consumo de ATP y desplazadas al interior del núcleo donde tiene lugar la degradación, como se muestra en la fig. 3 (Koolman & Klaus-Heirrich, 2005).

2.3.2 El núcleo

El core 20S está formado por cuatro anillos apilados con subunidades homologas ordenadas en forma de barril, donde las subunidades α son estructurales mientras que las β poseen actividad catalítica. La parte superior y la inferior están formados por 7 subunidades α , mientras que los dos cilindros centrales están formados por 7 subunidades β . Las subunidades β_1 , β_2 y β_5 tienen tres componentes catalíticos denominados X, Y y Z. El componente X tiene una actividad enzimática similar a quimotripsina y actúa después de residuos hidrofóbicos; el componente Y tiene la capacidad de hidrolizar peptidil-glutamil péptidos y actúa después de residuos ácidos; el componente Z tiene una actividad similar a tripsina y actúa después de residuos básicos (Rabinovich, 2004).

Mediante estudios realizados por cristalografía se encontró que el núcleo representa otro mecanismo de regulación interna para la entrada de las proteínas, debido a que el centro de los anillos- α permanece por completo cerrado lo que previene que las proteínas no ubiquitinadas entren en contacto con los anillos β que son los sitios proteolíticamente activos. Sin embargo no se sabe aún que factores favorecen el que se abra o se cierre el arco de los anillos- α , pero se cree que está asociado a la desnaturalización de las proteínas las cuales al unirse al anillo- α facilitan su pase a través del arco, para posteriormente entrar en

contacto con los anillos β , y como resultado producir péptidos con 3-15 residuos de aminoácidos (Ciechanover, 2010b).

2.3.3 Proteínas reguladoras 19S (19S-RPs)

La 19S-RPs están compuesta por 19 subunidades, las cuales sirven para reconocer, desplegar y traslocar la proteína sustrato al centro proteolítico. A su vez estas pueden dividirse en dos subcomplejos: la base y la tapa.

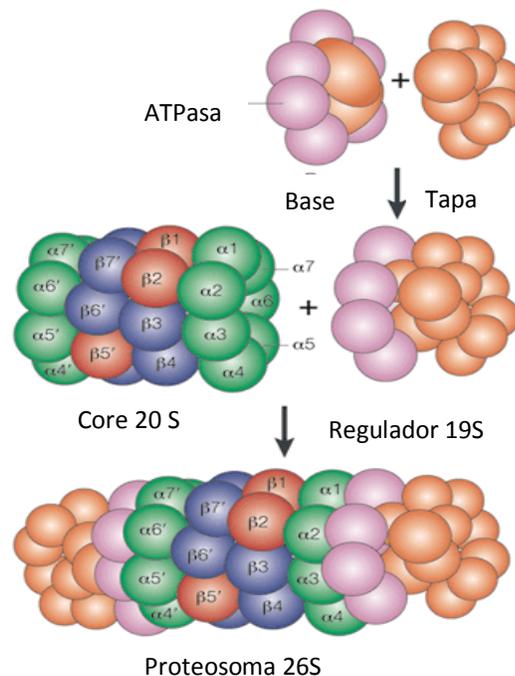


Fig. 3 Estructura del proteosoma 26S con sus diferentes subunidades (Kloetzel, 2001)

La base consiste en un hexámero ensamblado con subunidades de AAA-ATPase (Rpt1-6), junto con cuatro subunidades no ATPasas (Rpn1 y Rpn2, Rpn 10 y Rpn 13) y estas se unen directamente al anillo α del core 20S. Se piensa que el Rpt se ensambla para producir la hidrólisis de ATP al desplegar las proteínas (Da Fonseca, He, & Morris, 2012). Se requiere esta partícula reguladora para la degradación de sustratos de poli-ubiquitina. En el caso de la tapa se tienen tres funciones fundamentales:

- Reconocer las proteínas ubiquitinadas
- Promover el despliegue del sustrato
- Abrir el canal del anillo alfa

La tapa está compuesta por nueve subunidades no ATPasas (Rpn3, Rpn 5, Rpn6, Rpn7, Rpn 8, Rpn 9, Rpn11, Rpn 12 y Rpn 15). Su función principal es quitar la cadena ubiquitina del sustrato que va a ser degradado, la Rpn 11 es la encargada de reciclar las cadenas de ubiquitina al romperlas. Las subunidades ubicadas en las proteínas reguladoras 19S contienen colectivamente receptores de ubiquitina, deubiquitina y activadores de ATPasa (Da Fonseca, He, & Morris, 2012).

2.3.4 Otros tipos de proteosomas

Existen otras proteínas reguladoras denominadas 11S, las cuales están asociadas al complejo proteico denominado inmunoproteasoma, el cual es necesario para el procesamiento eficiente de antígenos. El complejo activador PA28 o REG mejora la generación de péptidos de unión al Complejo Mayor de Histocompatibilidad I (MHC-I), mediante la alteración del patrón de corte del proteasoma (Grune, 2012).

El inmunoproteasoma es una forma modificada de la subunidad 20S, las subunidades catalíticas β constitutivos (Delta, Z y X) se sustituyen por las subunidades inducibles LMP2, LMP7 y MECL, los dos primeros están codificadas por el MHC-I, como se muestra en la fig. 4. Mientras que la subunidad 11S (PA28) reemplaza el regulador 19S. El complejo PA28 se expresa constitutivamente en células presentadoras de antígeno y su expresión es regulada por la presencia del interferon (Tanaka, 1998). Las proteínas 11S forman una estructura heptamérica que promueve la degradación de péptidos cortos. Hay tres diferentes PA28 que pueden unirse al anillo α del 20S a través de secuencias C-terminales, e inducir cambios conformacionales. Cada complejo activador confiere especificidad de proteasa única para los 20S (Ciechanover 2010b).

También existe el timoproteosoma, el cual solo se encuentra presente en las células epiteliales corticales del timo (cTECs), se cree que su función tiene que ver con la selección positiva en los timocitos por su asociación a la MHC-I. En estudios realizados en insectos como la *Drosophila* y algunas plantas se han encontrado subtipos de proteosomas que se diferencian de la de los mamíferos principalmente en la cantidad de anillos que presenta el complejo proteico.

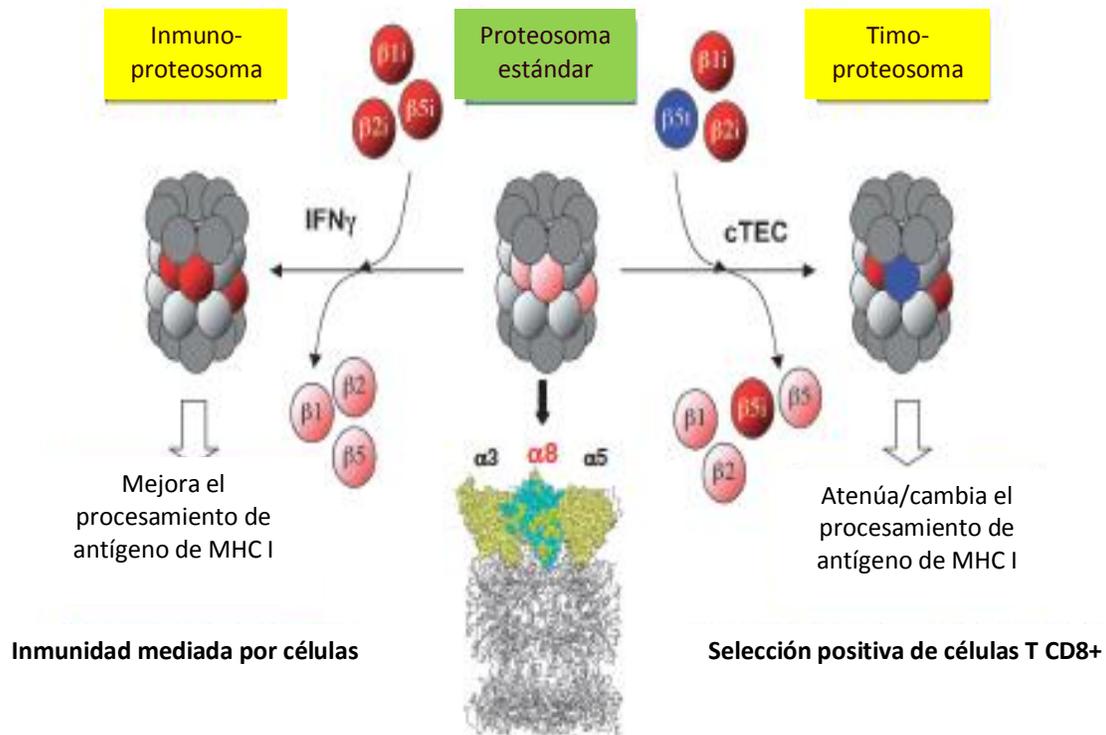


Fig. 4 Representación esquemática de diversos proteosomas. A la izquierda se encuentra el inmunoproteosoma el cual se expresa en respuesta al $IFN\gamma$, a la derecha el timoproteosoma el cual se encuentra específicamente en las cTECs y en el centro el proteosoma estándar (Ciechanover, 2010b)

2.4 Ubiquitina

2.4.1 Generalidades

La ubiquitina es un polipéptido constituido por 76 aminoácidos con un PM de 8.5 KDa, la cual puede existir ya sea covalentemente unido a otra proteína, o de forma libre. Cuando se une covalentemente a una proteína sustrato, puede encontrarse ya sea como un monómero (monoubiquitina), un polímero unido a través de diferentes residuos de Lys (cadenas de poliubiquitina) o un polímero lineal unido a través del iniciador Met de la ubiquitina (cadenas lineales de poliubiquitina). Por lo tanto su función dependerá del residuo de Lys al que la ubiquitina esté vinculada, por ejemplo:

- Lys-6 puede estar implicada en la reparación del DNA
- Lys-11 participa en ERAD (degradación asociada a retículo endoplasmático) y en la regulación del ciclo celular
- Lys-29 está implicada en la degradación lisosomal
- Lys-48 está implicada en la degradación de proteínas a través del proteosoma

- En el caso de las cadenas lineales de poliubiquitina asociadas a Met estas se encuentran asociadas a la señalización celular

Generalmente se encuentra conjugado con residuos de Lys de la proteína diana, sin embargo, en raros casos se ha observado la conjugación con restos de Cys o Ser, cuando la poliubiquitina tiene funciones distintas, como en la activación de las proteínas cinasas y en la señalización celular (UniProt, 2013).

2.4.2 Función

La degradación de una proteína por el sistema de la ubiquitina, implica dos etapas sucesivas: la primera la conjugación covalente de múltiples residuos de ubiquitina a una proteínas y la segunda la degradación de la proteína ubiquitinada por el complejo del proteosoma, de acuerdo a los siguientes pasos:

1. El enlace covalente entre la ubiquitina y el sustrato proteico requiere la activación del grupo carboxilo terminal de la ubiquitina.
2. La ubiquitina se une a la enzima activador de la ubiquitina E1, mediante un enlace tioester de alta energía, entre el carboxilo terminal de residuo de glicocola y el residuo de cisteína del sitio activo de la enzima E1.
3. En esta reacción la enzima E1, hidroliza el ATP a AMP y PPi, con la intermediaria formación de E1-ubiquitina adenilato.
4. La ubiquitina así activada se transfiere entonces, desde E2, formando un enlace tioester similar al formado con la enzima E1.
5. La ubiquitina de esta manera, puede ser transferida directamente desde la enzima E2 al sustrato proteico, al que se une mediante un enlace isopeptídico a la E3 (Neutzner, Li, Xu, & Karbowski, 2012).

Sin embargo, esta no es su única función, ya que también se sabe que lleva acabo funciones no proteolíticas tales como la activación de la transcripción, el enrutamiento de proteínas a la vacuola lisosomal, la actividad de modificadores tipo ubiquitina o UBLs (que dirigen a las proteínas a su destino subcelular), la protección para evitar la ubiquitinación o el control de procesos como la autofagia entre otros eventos.

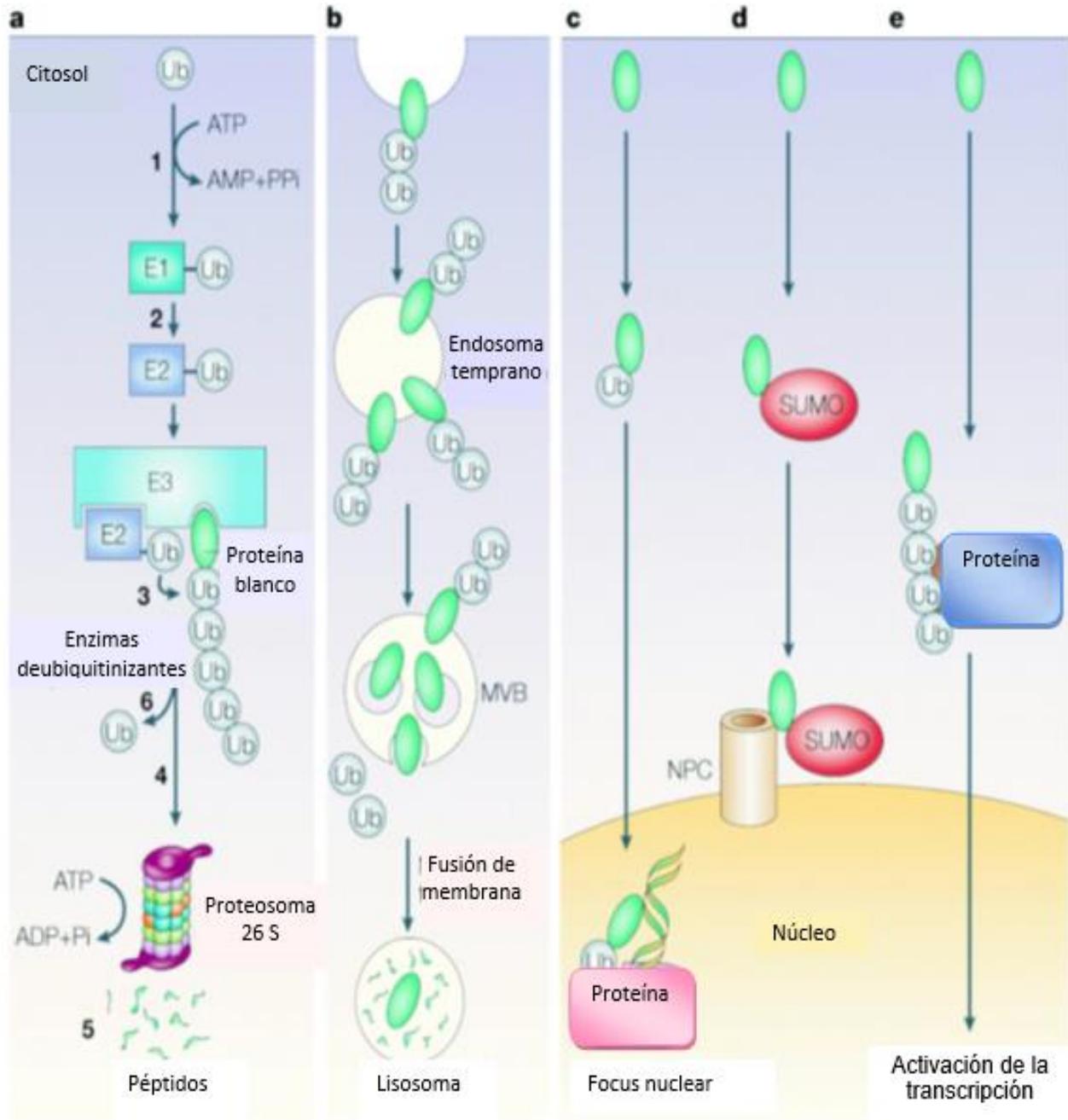


Fig. 5 Algunas de las diferentes funciones de la ubiquitina y proteínas tipo ubiquitina. a) Sistema Ubiquitina-Proteosoma. b) Mono u oligoubiquitinas asociadas a la degradación lisosómica. c) Monoubiquitinas d) Proteínas UBL para dirigir proteínas diana a su sitio de acción. e) Generación de cadenas de poliubiquitina para la activación de reguladores transcripcionales (Ciechanover, 2010b)

2.5 Enzimas deubiquitinizantes

2.5.1 Generalidades

El término de enzima deubiquitina (DUBs) es usado para describir cualquier enzima que pueda hidrolizar un péptido, amida, éster o tioéster unido a una molécula de ubiquitina después del carboxilo terminal en el residuo de Gly 76. Por lo tanto tienen el potencial de regular cualquier proceso celular mediado por la ubiquitina siendo mejor conocidos el proceso de proteólisis y el tráfico de proteínas/endocitosis.

En los mamíferos hay cerca 80-90 clases de DUBs las cuales se agrupan en cinco distintas familias basadas en la similitud de su mecanismo de acción. Cuatro de estas subfamilias son cisteína proteasas especializadas mientras que el quinto grupo es un tipo de metaloproteasas dependiente de zinc (Dang, Melandri, & Stein, 1998).

Las DUBs pueden actuar como reguladores negativos en la proteólisis al contrarrestar la acción de la maquinaria de ubiquitinación hacia sustratos específicos. Además de modular su actividad no proteolítica como es el tráfico de proteínas a través de membranas y los mecanismos de traducción de señales (Amerik, 2004).

2.5.2 Funciones

Como se muestra en la fig. 6, algunas DUBs son responsables de la maduración de la ubiquitina, ya que están involucradas en la regulación de proteínas precursoras y de los productos de los genes que codifican cadenas de poliubiquitina y ubiquitina unida a proteínas ribosómicas. Lo que da como resultado la generación de moléculas libres de ubiquitina (Reyes-Turcú & Wilkinson, 2009).

Las DUBs pueden remover cadenas de ubiquitina de proteínas modificadas post traduccionalmente, permitiendo la señalización inversa de ubiquitina o la estabilización de proteínas mediante el rescate del proteosoma o degradación lisosomal. Es decir contribuyen a la homeostasis de la ubiquitina (Amerik & Houchstrasser, 2004).

Otra importante función de las DUBs es que pueden actuar durante la primera etapa del Sistema Ubiquitina-Proteosoma, cortando el complejo de proteína diana-ubiquitina para permitir que las ubiquitinas puedan ser recicladas. Sin embargo una mutación o inhibición en la expresión de los genes que codifican para estas enzimas pueden producir un incremento de las ubiquitinas libres y como consecuencia tener efectos pleiotrópicos, como

incrementar la actividad de las funciones no específicas dependientes de ubiquitina o modificar su estructura (Komander, Clague, Urbe, & Sylvie, 2009).

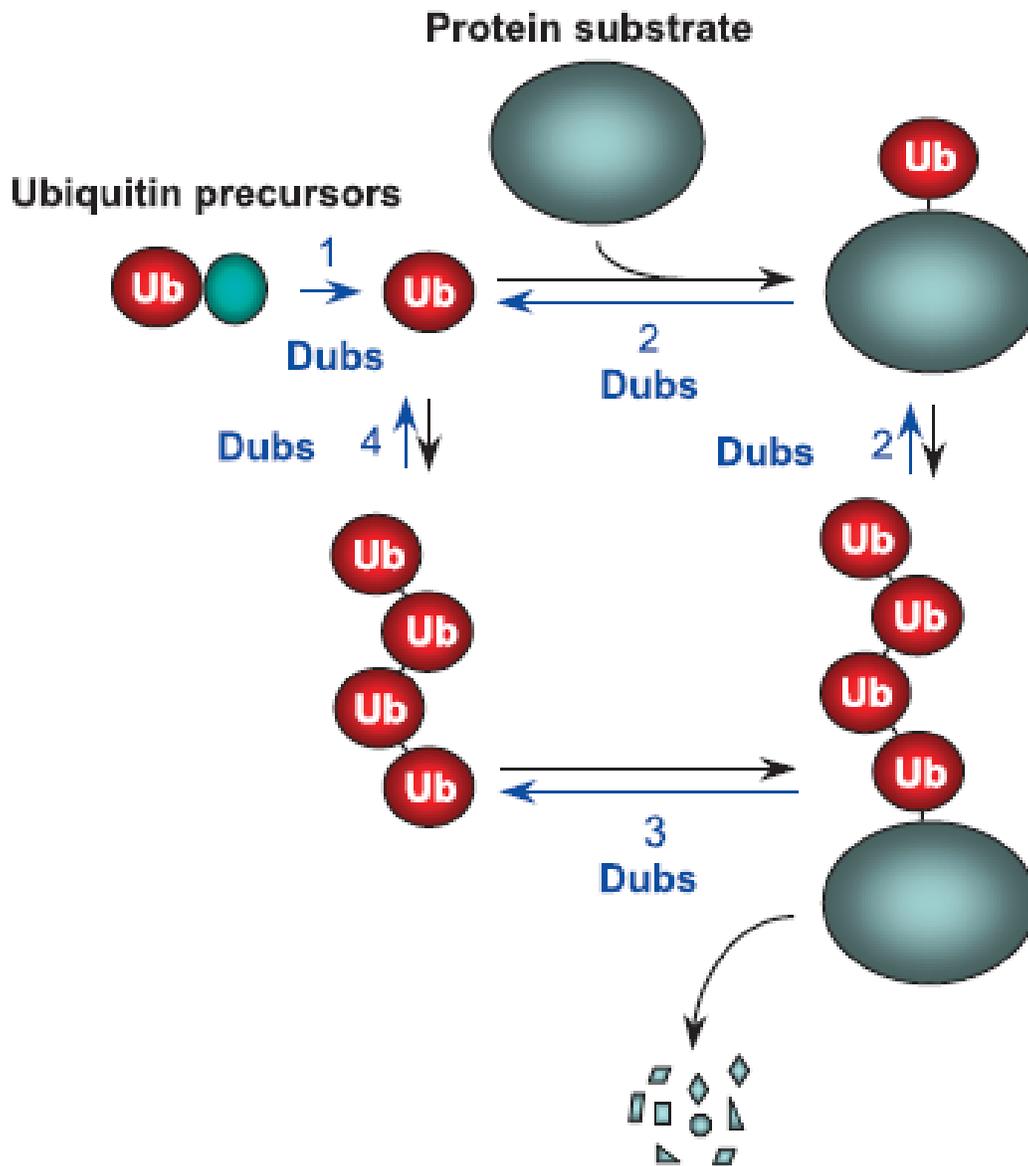


Fig. 6 Funciones de DUBs en la vía de ubiquitina. 1) Editan o rescatan ubiquitinas conjugadas. 2) Reciclaje de ubiquitina u oligómeros de ubiquitina antes de la degradación. 3) Desensamblaje de oligómeros de ubiquitina (Amerik & Houchstrasser, 2004)

Las cinco familias distintas en que se agrupan las enzimas deubiquitinizantes son las siguientes:

- 1) Ubiquitina C- terminal hidrolasas (UCHs)
- 2) Peptidasas específicas de ubiquitina (USPs/UBPs)

- 3) Proteínas de tumor de ovario (OTU)
- 4) Proteínas Josephin (MJD)
- 5) Jab1/MPN metaloproteasas de dominio-asociado (JAMMs)

2.5.2.1 Características estructurales de la familia de las enzimas UCH

En este trabajo fue objeto de estudio las enzimas deubiquitinizantes. Como se indica en la metodología para determinar la actividad de enzimas deubiquitinizante se utilizó la enzima UCH3, esta enzima forma parte de la familia Ubiquitina C-terminal hidrolasas. Esta familia de enzimas fue la primera en ser identificada, y gracias a estudios realizados se descubrió que pueden actuar en pequeños péptidos conjugados, por ejemplo aquellos que fueron producidos por el proteosoma o la degradación lisosomal, es decir solo pueden procesar extensiones cortas del C-terminal de precursores de polímeros de ubiquitinas.

Los dominios de las UCH consisten en 6 o 7 cadenas antiparalelas β y rodeado por 8 cadenas α hélice. La tríada catalítica se encuentra en la parte inferior de una bolsa en la superficie de la proteína. Esta bolsa es lo suficientemente amplia como para acomodar el motivo de glicina de la ubiquitina C-terminal, pero demasiado estrecha para acomodar los residuos con cadenas laterales más grandes. Muchas de las DUBs actúan predominantemente en ubiquitinas recicladas o que llegaron a ser conjugadas de manera inapropiada por nucleófilos intracelulares. Otros miembros de esta familia como la UCH37 se encargan de desensamblar cadenas de ubiquitina, y otros tienen la función específica de actuar durante el proceso de co-traducción de precursores de ubiquitina (Reyes-Turcú & Wilkinson, 2009).

2.5.2.2 Características estructurales de la familia de las enzimas USP/UBP

La familia UBP contiene dos motivos cortos, pero bien conservado llamados cajas de Cys y His que incluyen los sitios catalíticos, al contrario de la familia UCH las USPs generalmente cortan cadenas largas de ubiquitina.

Múltiples estudios han demostrado que su actividad catalítica es regulada por cambios conformacionales. Hasta el momento solo se conocen tres; la primera corresponde a la de la estructura de las USP7 que preferentemente deubiquitiniza a la molécula MDM2, que es la ligasa de ubiquitina para el supresor tumoral p53 (Reyes-Turcú & Wilkinson, 2009).

La siguiente conformación que se lleva a cabo es la de la USP14, la cual se encuentra asociada al proteosoma mediante la remoción de poliubiquitinas de proteínas sustratos que van hacer degradadas por este. Por último la forma conformacional de la USP8 la cual se

asocia a la remoción de la ubiquitina de sustratos (como el factor de crecimiento epidérmico) durante el proceso de endocitosis (Wu, Lo, & Lin, 2010).

2.5.2.3 Características estructurales de la familia de las enzimas OTU

Esta familia de proteínas poseen una estructura similar en cuanto al centro o core catalítico ya que poseen dominios conservados de Cys, His y Asp. La Otubain-2, es una proteína de la cual no se sabe su función biológica, mientras que la Otubain-1 se encarga de la regulación de la ligasa de E3 y se ha comprobado que induce la anergia de células T CD4. Otra OTU proteasa la VCIP135 es esencial para reensamblar los fragmentos mitóticos del aparato de Golgi, y también posee actividad deubiquitinizante contra las cadenas de poliubiquitina (Amerik & Houchstrasser, 2004).

2.5.2.4 Características estructurales de la familia de las enzimas Josephin

El cuarto grupo se caracteriza por el dominio llamado Josephin, la cual se encuentra presente en la proteína Ataxina-3 y cerca de 30 proteínas más. La Ataxina-3 es una proteína mutada que produce una enfermedad neurodegenerativa llamada espinocerebelosa de tipo 3. Muchas de las proteínas que tienen este dominio se desconoce sus funciones, sin embargo se sabe que tiene similitud con las cajas de His y Cys de las familias de UBPs y UCHs (Reyes-Turcú & Wilkinson, 2009).

2.5.2.5 Características estructurales de la familia de las enzimas JAMM/MPN

La última familia se caracteriza por poseer los dominios JAMM, estas proteínas se pueden encontrar en procariontes y eucariontes. Los tres dominios que están presentes en eucariontes poseen actividad de DUBs, por lo que se creó que solo están presentes en organismos altamente evolucionados. El primer dominio está representado por una subunidad del proteosoma Rpn11 (En levaduras)/ POH1 (En humanos) la cual corta las cadenas de ubiquitina; el segundo dominio es la proteína CSN5 que es una subunidad del COP9 signalosoma que corta Nedd8 (proteína ubiquitina) conjugado; y el tercer dominio es la AMSH una enzima deubiquitinizante asociada al proceso de endocitosis (Reyes-Turcú & Wilkinson, 2009).

2.6 Inhibidores del proteosoma

2.6.1 Características

En las últimas décadas se han descubierto diversos inhibidores de sitios activos del proteosoma. La actividad similar a quimotripsina del proteosoma ha sido el objeto principal de los primeros inhibidores desarrollados a base de péptidos de aldehído, sin embargo también se han desarrollado inhibidores para las proteínas reguladoras como la 19S, ATPasas y enzimas deubiquitinizantes (Lee, Kumar, Riley, & Morgan, 2010).

Los primeros inhibidores utilizaban péptidos hidrófobos, lo que los hacía más permeables y les facilitaba la entrada a la célula. Sin embargo, la mayoría de los inhibidores no solo inhibían la actividad similar a quimotripsina si no que también inhibían los sitios de caspasa y / o tripsina en concentraciones altas (Kisselev, Alexei F., Van der Linden Wouter, 2013).

2.6.2 Clasificación

En primera instancia los inhibidores del proteosoma se dividen en dos tipos los específicos y los no específicos. Los inespecíficos, como los antibióticos tiazoles y la ciomicina A, bloquean el proceso de traducción en la síntesis de proteínas en bacterias, al unirse a la subunidad larga del ribosoma. Además se ha descrito inhibidores alostéricos que no interactúan con los sitios activos.

Los específicos poseen diversas estructuras por lo que se pueden dividir en dos grupos en función de si forman o no un enlace covalente en el sitio activo de treonina. Todos los inhibidores covalentes son reversibles como los aldehídos, y hasta cierto punto los boronatos como se muestra en la fig. 7. El mecanismo de acción de los inhibidores covalentes consiste en una trampa electrofílica donde interactúan los sitios activos de treonina y un péptido del inhibidor. Basado en esta naturaleza se pueden dividir en 8 tipos diferentes:

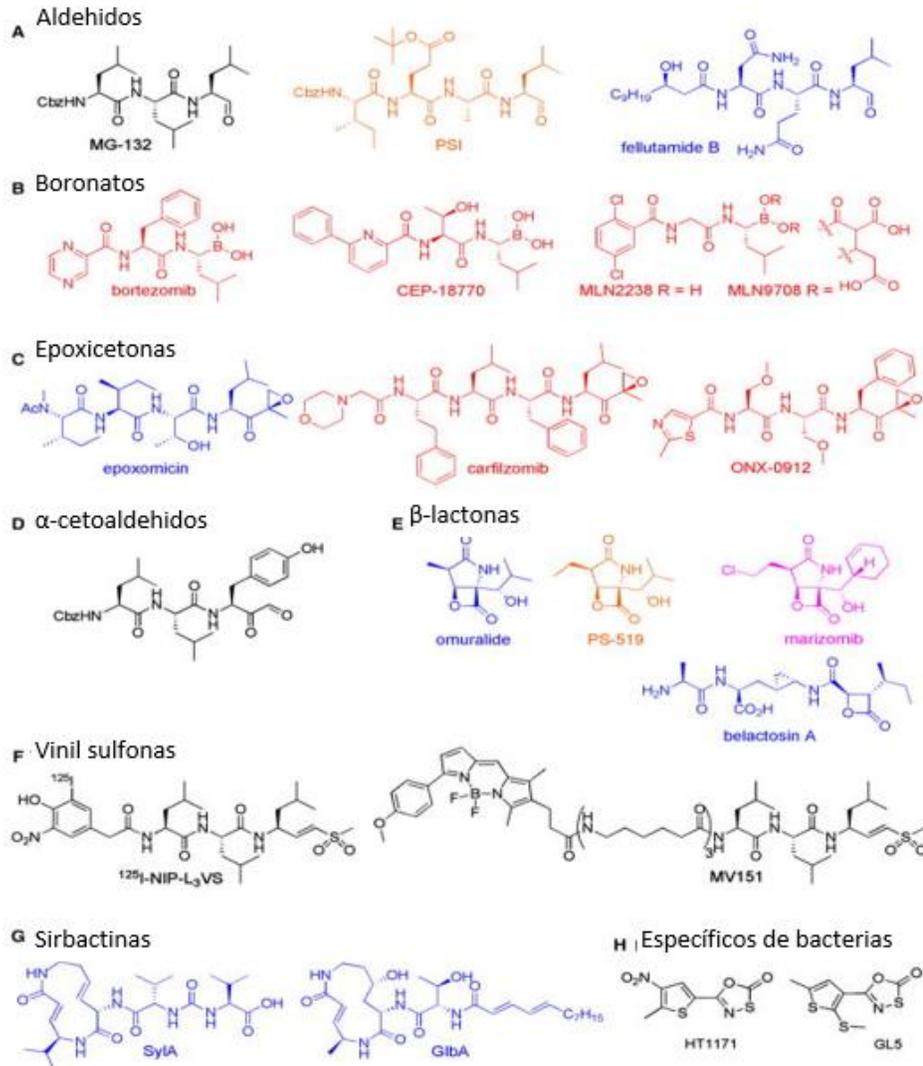


Fig.7 Diferentes inhibidores covalentes del proteosoma (Kisselev, Alexei F., Van der Linden Wouter, 2013)

2.6.3 Inhibidor MG 132

En general los péptidos aldehídos forman enlaces reversibles y son potentes inhibidores del proteosoma, ya que bloquean el sitio activo de las treoninas formando un complejo hemiacetal con el hidroxilo de éstas. Los aldehídos además son inhibidores conocidos de serina y cisteína proteasas.

El MG 132 (carbобензохи-Leu-Leu-leucinal) que se muestra en la fig. 8, es un péptido aldehído que no solo inhibe al proteosoma 26S, sino que también inhibe las catepsinas y calpains. Su mecanismo de acción está ligado al complejo del proteosoma 26S en su actividad similar a quimotripsina, además se ha comprobado que induce la muerte por

nucleófilos celulares puede ser contrarrestada por agentes reductores, antioxidantes o quelantes de hierro, pero también puede ser incrementada por los inhibidores del sistemas glutatión reductasa/peroxidasa o por déficit de selenio (Poljsak & Milisav, 2012).

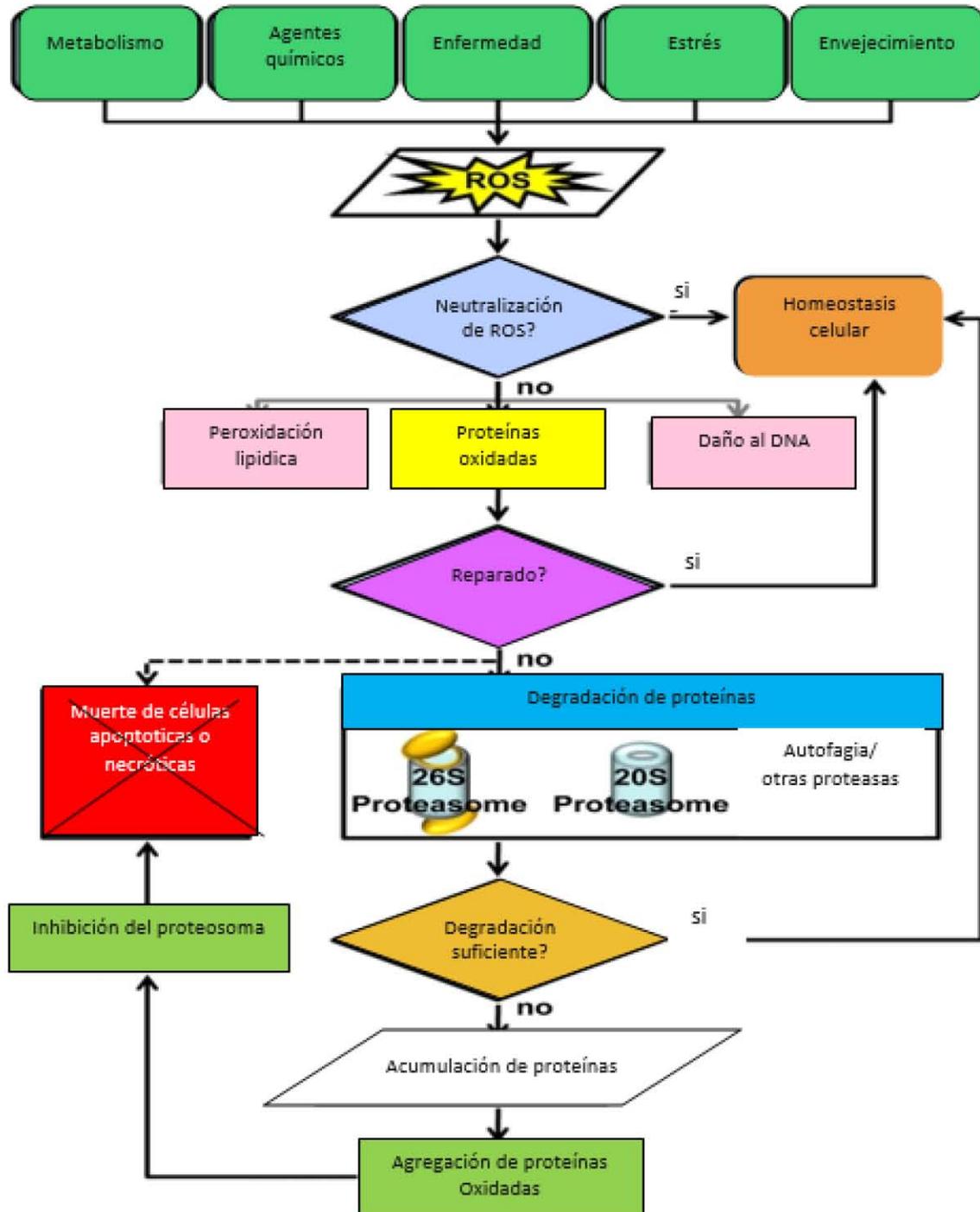


Fig. 9 Respuesta celular al estrés oxidativo. Se muestra como la producción de especies reactivas de oxígeno, resultan en una respuesta celular hasta llegar a un equilibrio (homeostasis) (Aiken, Kaake, Wang, & Huang, 2011).

2.7.1 Formación de radicales libres

Un radical libre (R) es la especie química que posee uno o más electrones desapareados o desacoplados en un orbital atómico o molecular, por lo que pueden tener carga positiva, negativa o neutra. Los procesos que involucran la producción de radicales libres son:

- Termolisis
- Radiolisis
- Fotolisis o fotodisociación
- Oxidantes

A nivel celular el oxígeno molecular puede ser reducido parcialmente por reacciones enzimáticas o no enzimáticas, lo que permite la producción de otras especies reactivas como las que se indica la siguiente tabla:

Radicales libres	No radicales
De oxígeno	De oxígeno
Superóxido, O ⁻	Peróxido de hidrógeno, H ₂ O ₂
Hidróxilo, OH [*]	Ozono, O ₃
Hidroperóxido, HO [*] ₂	Singlete de oxígeno, ¹ O ₂
Peroxilo, RO [*] ₂	Peróxidos orgánicos, ROOH
Alcohexilo, RO [*]	De nitrógeno
De nitrógeno	Ácido nitroso, HNO ₂
Óxido nítrico, NO [*]	Catión nitrosilo, NO ⁺
Dióxido de nitrógeno, NO [*] ₂	Anión nitroxilo, NO ⁻
De cloro	Catión nitrilo (nitronio), NO ⁺ ₂
Cloro atómico, Cl [*]	Peroxinitrito, ONOOR
De bromo	Cloruro de nitrilo (nitronio), NO ₂ Cl
Bromo atómico, Br [*]	De cloro
	Gas cloro, Cl ₂
	Ácido hipocloroso, HOCl
	Cloraminas

Tabla 1 Resumen de las especies reactivas ordenadas según crece su actividad (Repetto Jiménez & Repetto Kuhn, 2009)

Las especies reactivas de oxígeno o (ROS) se producen en todos los organismos aerobios, en los que los agentes tóxicos, incluidos los contaminantes ambientales, perturban el equilibrio redox celular y conducen a una alteración de las funciones biológicas normales. Se producen constantemente durante la oxidación normal de los productos alimenticios, debido a fugas en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. La producción de ROS en la mitocondria es modulada en gran medida por la tasa de flujo de electrones a través de complejos de la cadena respiratoria. Algunas enzimas como la xantina oxidasa y

la aldehído oxidasa forman el radical de anión superóxido o peróxido de hidrogeno como se muestra en la fig. 10 (Vasudevan, Sreekumari & Vaidyanathan, 2011).

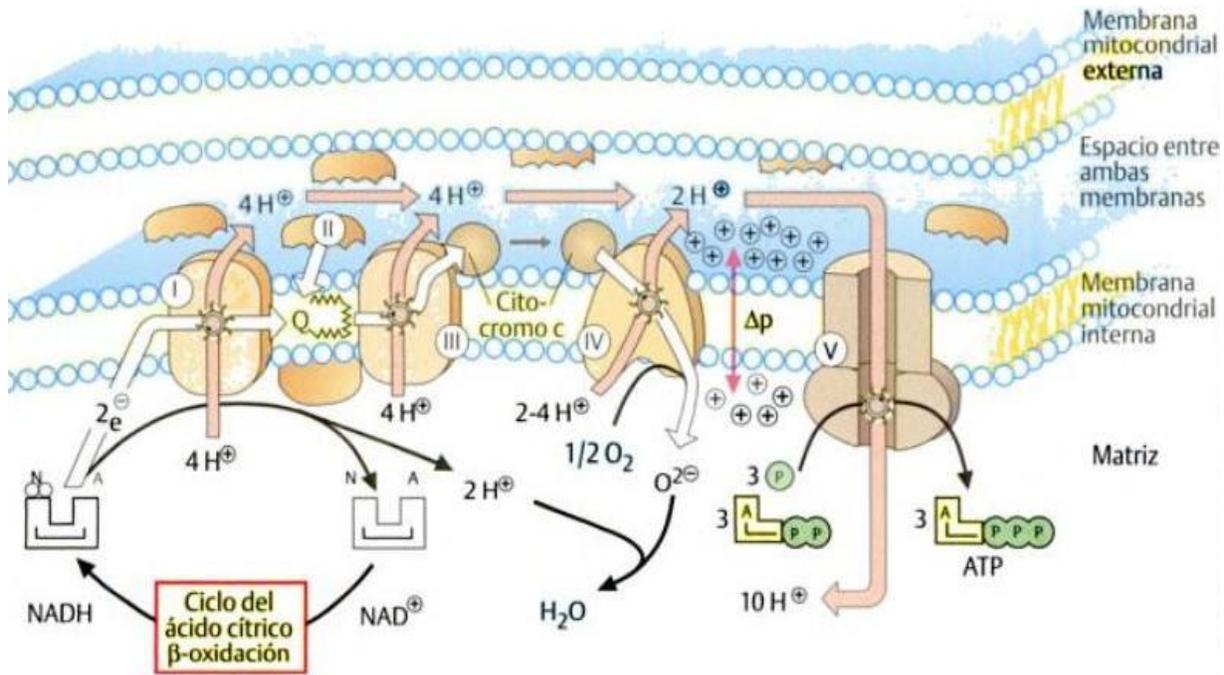


Fig. 10 Representación esquemática de la cadena respiratoria

2.7.2 Mecanismos antioxidantes de la célula

En el organismo existen dos tipos de mecanismos para la transformación de radicales libres a moléculas estables; enzimáticos y no enzimáticos. Entre los mecanismos enzimáticos destacan los catalizados por las enzimas: Superóxido dismutasas (SOD), catalasa, y las glutatión peroxidasas. Mientras que los no enzimáticos están representados por el mecanismo de la vitamina A, C, E, bilirrubina, ácido úrico, albúmina y glutatión (Repetto Jiménez & Repetto Kuhn, 2009).

Las principales reacciones biológicas donde se generan radicales libres están:

a) Reacciones enzimáticas

- Cadena respiratoria
- Formación de superóxido durante la fagocitosis
- Reacciones catalizadas por la oxidasa de NADPH
- Reacciones catalizadas por la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa
- Reacciones catalizadas por la D-aminoácido oxidasa

b) Procesos biológicos no enzimáticos

- Procesos en los que intervienen metales de transición
- Glucosilación de proteínas

- Catabolismo de catecolaminas
- Procesos en los que intervienen grupos sulfhidrilo

Las enzimas de la familia glutatión peroxidasa catalizan la degradación de peróxido de hidrogeno y de peróxidos lipídicos, para lo cual utilizan electrones procedentes de la oxidación del glutatión, que actúa como coenzima. Como alternativa los mecanismos enzimáticos, existen numerosos compuestos, liposolubles e hidrosolubles, que tienen capacidad de captar o ceder electrones, transformando los radicales libres en moléculas estables. Estos compuestos neutralizan radicales libres que escapan al control de los mecanismos enzimáticos antes descritos (Martin, & Taismann, 2009).

A nivel del proteosoma se lleva a cabo la s-glutationilación, la cual es una respuesta celular al estrés oxidativo, en donde hay una unión covalente de glutatión (GSH) a los grupos tiol de las proteínas. Hay dos mecanismos por los que las proteínas pueden ser glutatióniladas: GSH puede reaccionar con grupos tiol oxidados (por ejemplo, Cys - Cys - SOH o SS - Cys), o el glutatión oxidado (GSSG) puede reaccionar con residuos tiol (por ejemplo, Cys - SH). GSH se considera que tiene la función antioxidante, ya que estabiliza los grupos tiol de proteínas oxidadas mediante este proceso, que además se cree es la señalización redox a través del cual se regula la actividad del proteosoma en función del estado redox de células en mamíferos (Aiken, Kaake, Wang, & Huang, 2011).

Recapitulando:

El Sistema Ubiquitina Proteosoma se encarga de la proteólisis de las proteínas a nivel intracelular, además de regular un gran número de procesos celulares, por lo tanto es importante estudiar los efectos que puedan llegar a tener la exposición de xenobióticos como lo son las nanopartículas sobre su función. Como consecuencia a esta exposición puede producirse la activación o inhibición de los componentes que lo conforman, lo cual puede ser de gran utilidad en su aplicación como acarreadores de fármacos, se ha documentado en varios desordenes un beneficio al modificar el funcionamiento de este sistema al inhibir o activar la síntesis de macromoléculas específicas.

Ya se han realizado estudios en cuanto el efecto de la actividad proteosomal en nanopartículas oxido metálicas como las de óxido de titanio, selenio, de oro cubiertas con poli etilenglicol, y a base fosfatidilglicerol. Sin embargo no se han estudiado los efectos que las nanopartículas a base de SiO₂, PECA y Quitosán-GSH puedan tener en la función de este sistema multicatalítico razón por la cual se llevó a cabo este estudio.

2.8 Nanopartículas

2.8.1 Historia

La característica más importante de la Nanotecnología es su utilidad en muchas disciplinas, pues se trata de una disciplina en donde se unen ideas técnicas y diversas áreas del conocimiento como la Química, la Biológica, la Medicina y la Tecnología entre otras. Está orientada a entender cómo se da y que consecuencias produce su interacción entre los “nano-objetos” como átomos, moléculas, proteína, DNA etc. (Serena, 2013).

La nanotecnología es una ciencia que ha tenido su auge en los últimos años en el área de Farmacología debido a la necesidad de obtener fármacos más específicos y menos tóxicos. Tiene sus inicios en Paul Erlich, quien fue el primero en pensar en un sistema que fuera específico hacia un sitio blanco, cualidad que pensó podría ser de utilidad en la Farmacología, a este sistema lo denominó “bolas mágicas”.

A finales de los 60s aparece uno de los primeros pioneros en nanopartículas. El profesor Peter Paul Speiser, fue el primero en enfocarse en el uso de las nanopartículas con el fin de utilizarlas en su aplicación para vacunas. Sin embargo no fue hasta 1969 cuando Gerd Birrenbach uno de sus estudiantes estudio la activación del sistema inmune en respuesta a la presencia de nanocápsulas o nanopartículas empleando un proceso al que llamo polimerización micelar. Así mismo el primero en acuñar el término de Nanotecnología fue N. Taniguchi en el año de 1974 (Kreuter, 2007).

Posteriormente Hemut Kopf trabajó en el mismo proceso que G. Birrenbach pero con el objetivo de obtener las primeras nanopartículas para la liberación sostenida de drogas por vía intravenosa. Sin embargo no fue hasta el año de 1978 que Jorg Kreuter publicara el primer artículo de revisión sobre nanopartículas. Lo que dio paso a la creación de una definición que retomarían la industria y la farmacéutica.

Otro pionero en nanopartículas fue Patrick Couvreur, quien produjo la primer Nanopartícula de acrílico rápidamente biodegradable la cual estaba hecha de polimetilcianoacrilato y polietilcianoacrilato. Posteriormente se fueron ampliando los materiales con los que estas se producían de acuerdo a las características bioquímicas que se requerían en cada una de ellas (Kreuter, 2007).

Hoy en día se busca su aplicación para todas las áreas, sin embargo en el área de Farmacología a pesar de que ya se han producido nanopartículas con diversos materiales,

los efectos asociados a estos sistemas todavía siguen siendo inciertos ya que se requiere realizar varios estudios y aplicarlos en diversos modelos de experimentación para determinar su toxicidad y los efectos secundarios que pudieran producirse.

2.8.2 Definición

Una definición usada con propósitos farmacéuticos es que las nanopartículas son partículas sólidas coloidales que tienen un rango de tamaño de 10 a 1000 nm (1µM) y están conformadas por materiales macromoleculares en los cuales el principio activo es disuelto, entrampado, encapsulado, absorbido o enlazado en la matriz de las nanopartículas y / o con el principio activo (drogas o material biológico activo) (Kreuter, 2007).

Así mismo dependiendo de su composición y propiedades se pueden obtener nanoesferas o nanocápsulas.

- Las *nanocápsulas* son sistemas vesiculares en donde la sustancia activa está confinada en un núcleo lipídico o acuoso rodeada por una membrana polimérica de una o múltiples capas.
- Las *nanoesferas* son sistemas de gel y coloidales que contienen una sustancia activa, adsorbida en la superficie o disuelta en el interior de la partícula.

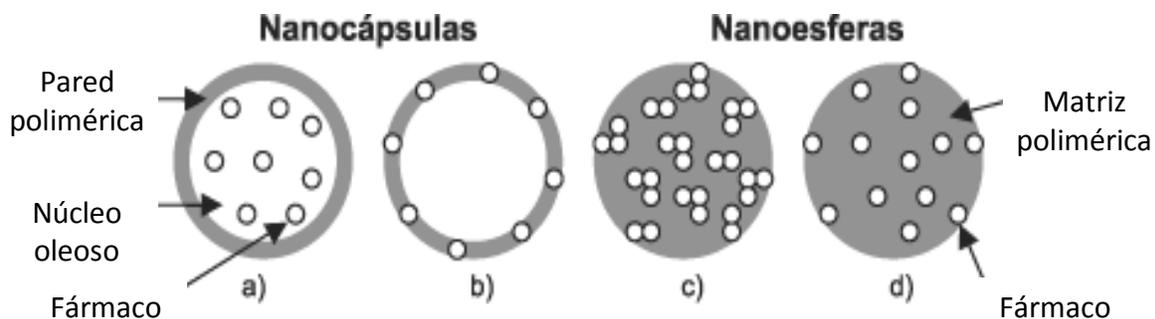


Fig. 11 Representación esquemática de nanocápsulas y nanoesferas. a) Fármaco disuelto en el núcleo de la nanocápsula. B) Fármaco absorbido en la pared polimérica. C) Fármaco retenido en la matriz polimérica. D) Fármaco absorbido o disperso en la superficie (Schaffazick, & Guterres, 2003)

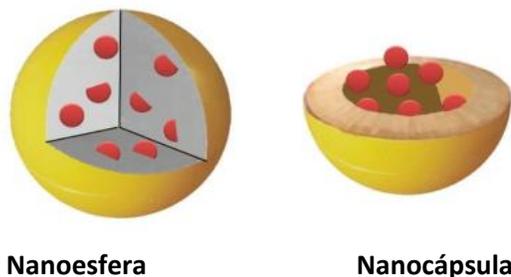


Fig. 12 Representación gráfica de la estructura de una nanoesfera y una nanocápsula (Ramos-Cabrer & Campos, 2013)

Las nanopartículas pueden prepararse con diversos materiales tales como proteínas, polisacáridos y polímeros sintéticos biodegradables. La selección de la base del polímero está basada en diversos factores como:

- 1) El tamaño que se desea de la nanopartícula.
- 2) Las propiedades de la droga (solubilidad, estabilidad etc.) que se desea transportar en el polímero.
- 2) Características de la superficie y funcionalidad
- 3) El grado de biocompatibilidad y biodegradación
- 4) El perfil de liberación del fármaco

Sin embargo también deben de considerarse las variables independientes al momento de prepararse las nanopartículas como son: el tipo de surfactante/ estabilizador (ya sea moléculas sintéticas o naturales) y la concentración del estabilizador (tensoactivo), ya que de agregarse a bajas concentraciones se corre el riesgo de que se produzcan nano-gotas y por lo tanto la obtención de nanopartículas va a ser poca, mientras que en caso contrario si se agrega más concentrado la cantidad de fármaco en la nanopartícula se ve reducido (Mahapatro & Singh, 2011).

2.8.3 Métodos de preparación

2.8.3.1 Dispersión de polímeros preformados

Este es uno de los métodos más comunes para la preparación de nanopartículas como poli ácido láctico (PLA), poli D-L- glicolido (PLG), poli D-L-láctico-glicolido (PLGA) y policianoacrilato (PCA), puede llevarse a cabo de distintas maneras.

a) Método de evaporación del solvente

Para esta técnica el polímero se disuelve en un disolvente orgánico, la mezcla de la solución del polímero y el fármaco se emulsiona luego en una solución acuosa que contienen un tensoactivo o agente emulsionante para formar una emulsión de aceite en agua. Una vez que se haya formado una emulsión estable se evapora el solvente orgánico mediante el incremento de la temperatura o de presión, con continua agitación de la solución (Pinto Reis, RJ, AJ, & F, 2006).

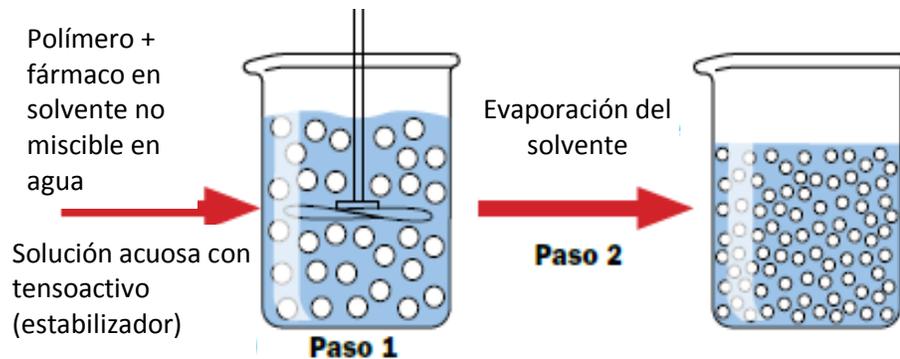


Fig.13 Método de evaporación de solvente (Llabot, Palma, & Allemandi, 2008)

b) Método de doble o múltiple emulsión

En esta técnica el fármaco hidrófilo y un surfactante se disuelven en agua. La emulsión primaria es preparada por la dispersión de la fase acuosa en un disolvente orgánico que contiene un polímero disuelto. Por lo tanto se considera una re-emulsificación con una nueva fase acuosa que contiene también surfactante. Luego, se lleva a cabo un procedimiento similar a la técnica de emulsión simple en cuanto a eliminación y recolección de las nanopartículas (Pinto Reis, RJ, AJ, & F, 2006).

c) Método de emulsificación espontánea o difusión de solvente

Esta técnica es un método de difusión modificado, consiste en agregar un solvente miscible en agua con un solvente orgánico insoluble. Durante la difusión de los solventes se forma una interface que permite la formación de pequeñas partículas, habiendo una correlación al incrementar la concentración del solvente soluble en agua con la disminución del tamaño de las mismas (Mahapatro & Singh, 2011).

d) Nanoprecipitación

Esta técnica se usa principalmente para drogas hidrofóbicas. El polímero y las drogas se disuelven en un solvente polar soluble en agua. Luego esta solución es agregada por goteo controlado a una solución acuosa con surfactante. Las nanopartículas se forman

instantáneamente por la difusión del solvente y finalmente el solvente se remueve mediante presión reducida y las nanopartículas permanecen en la suspensión acuosa.

e) *Salting out*

Mediante esta técnica se forma una emulsión agua/aceite que contiene polímeros, agua, acetona, acetato de magnesio, estabilizador (tensoactivo) y el componente activo. En esta técnica el polímero es disuelto en una fase orgánica, la cual puede ser miscible en agua. La fase acuosa contiene el emulsificante y una alta concentración de sales que no son solubles en la fase orgánica (Mahapatro & Singh, 2011)..

Contrariamente a la técnica de difusión en emulsión, no hay difusión del disolvente debido a la presencia de sales lo que permite la formación de las nanopartículas. El paso final es la purificación de las nanopartículas por flujo cruzado, filtración o centrifugación para eliminar el desplazamiento salino.

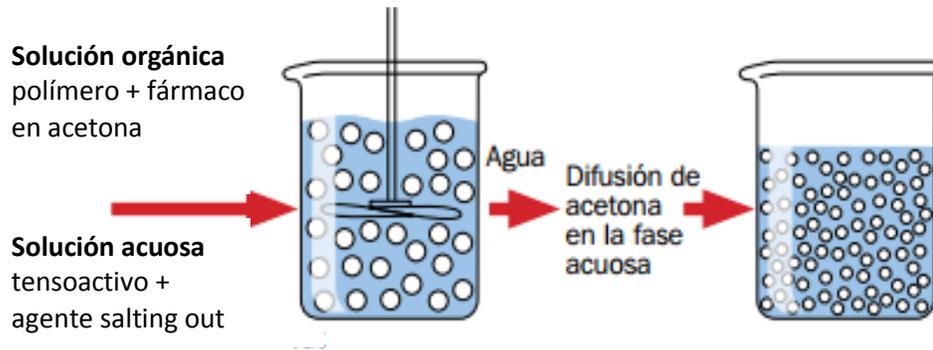


Fig. 14 Método de Salting out (Llabot et al., 2008)

2.8.3.2 Método de polimerización interfacial

Esta técnica utiliza la velocidad de polimerización de los polímeros. Utiliza monómeros que se disuelven con el fármaco en éter o etanol y forman un compuesto, el cual al ser extraída por una aguja sobre una solución acuosa del surfactante permite la formación de nanocápsulas en forma espontánea al contacto con los iones del agua. Además la concentración del surfactante y su estabilidad determinan el tamaño final de la nanopartícula formada. Unos de los polímeros que se usan para este método son PECA, poli isobutilcianoacrilato, y poli isohehexilcianoacrilato (Schaffazick, & Guterres, 2003)

2.8.3.3 Gelificación iónica o coacervación de polímeros hidrofílicos

Para este método se utilizan polímeros hidrofílicos naturales como son alginato, gelatina, quitosán y la agarosa. Este técnica involucra la transición de materiales de forma

líquida a gel debido a interacciones iónicas a temperatura ambiente, mediante el endurecimiento de la solución de gelatina emulsificada a nanopartículas de gelatina. Las gotas de emulsión de gelatina formadas se dejan enfriar debajo del punto de solidificación en un baño de hielo hasta que se transforman en nanopartículas. Las nanopartículas de quitosán se preparan mediante este método por la formación espontánea de complejos entre quitosán y polianiones o por la gelificación de una solución de quitosán dispersado en una emulsión de aceite (Pinto Reis, RJ, AJ, & F, 2006).

2.8.4 Caracterización

Existen diversos métodos de caracterización de nanopartículas algunos de los cuales se muestran en la siguiente tabla y otros que van explicarse a detalle a continuación y son los que se emplearon en las nanopartículas motivo de este trabajo.

Parámetro	Método
Tamaño de nanopartícula	Espectroscopia de correlación de fotón. (PCS por sus siglas en inglés)
	Microscopía electrónica de transmisión. (TEM por sus siglas en inglés)
	Microscopía electrónica de barrido. (SEM por sus siglas en inglés)
	SEM combinado con energía dispersiva.
	Espectrometría de rayos X
Peso Molecular	Cromatografía de permeación en gel.
Densidad	Picnometría de compresión de Helio.
Cristalinidad	Difracción de Rayos X.
	Calorimetría de Barrido diferencial.
Carga superficial.	Electroforesis
Hidrofobicidad	Cromatografía de interacción hidrofóbica.
	Medición del ángulo de contacto
Propiedades superficiales	Espectrometría de masas de ión secundario estático. (SSIMS)
Análisis de elemento superficie	ESCA (Espectroscopia foto electrónica de rayos X por análisis químico).

Tabla 2 Métodos de caracterización de nanopartículas (Díaz, 2007)

2.8.4.1 Tamaño de partícula

El tamaño de la partícula influye en el tiempo de resistencia, sus propiedades ópticas, la superficie, y la capacidad de participar en una atmosfera química así como los efectos en la salud que pueda llegar a tener (Zeta-meter, 2011). La espectroscopia de correlación de fotones (PCS) y la difracción laser (LD) son las técnicas más utilizadas para medir tamaño de partícula. La liberación del fármaco es afectada por el tamaño, esto se debe al área superficial lo que facilita la liberación a diferencia de partículas grandes que poseen un mayor núcleo (De la Cruz, 2010).

2.8.4.2 Dispersión de luz dinámica y difracción laser

La DLS (también conocida como *dynamic light scattering*) mide la fluctuación de la intensidad de la luz esparcida, la cual es causada por el movimiento browniano de la partícula (De la Cruz, 2010). Por esta razón, el tamaño de partícula está influenciado por la interacción de las partículas con el medio en el que se encuentran, por lo cual debe de conocerse la viscosidad del medio.

La difracción laser (LD) no determina el tamaño de las partículas a partir de la variación temporal sino de la dependencia de los ángulos de la intensidad de dispersión. La ventaja de usar la dispersión de luz es el poder analizar las muestras que contienen una distribución amplia de especies de masas moleculares muy diferentes y detectar cantidades pequeñas de las especies de mayor masa. La precisión de los tamaños de partícula mejora si se utilizan factores de esparcimiento derivados de la teoría de Mie. El cálculo de los factores de Mie requieren conocer el índice de refracción de las partículas, el cual puede sustituirse por el índice de refracción del polímero con el cual se hayan fabricado las nanopartículas (Kreuter, 2007).

2.8.4.3 Potencial Zeta (Z)

Otra característica de las partículas poliméricas es el potencial zeta. El potencial zeta es la medida de la carga de la partícula, por lo tanto cuanto mayor sea el valor absoluto del potencial zeta mayor será la cantidad de carga de la superficie. Este parámetro por lo tanto nos indica la estabilidad de la nanopartícula, además puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento del colide puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en la fuerzas de repulsión entre los coloides. Las nanopartículas con un potencial zeta de (+/-) 30 Vm son físicamente estables en suspensión, debido a que la carga de la superficie evita la agregación de las partículas (Hans & Lowman, 2002).

Estabilidad	Potencial Z (mV)
Muy buena	-100 a -60
Buena	-60 a -40
Moderada	-40 a -30
Umbral de dispersión	-30 a -15
Umbral de aglomeración	-15 a -10
Fuerte aglomeración y precipitación	-5 a +5

Tabla 3 Valores asociados a la estabilidad de las partículas en función al potencial Z (Zeta-meter, 2011)

2.8.4.4 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

El Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) opera con los mismos principios básicos que el microscopio óptico, pero utiliza electrones en lugar de luz. Sin embargo lo que se puede observar con este tipo de microscopio está limitado por la longitud de onda de la luz. La parte superior del microscopio emite los electrones que viajan a través del vacío de la columna del microscopio. Este microscopio usa lentes electromagnéticas para centrar los electrones en un haz muy fino. El haz de electrones se desplaza a través de la muestra que se desea estudiar (Curtis, 2006).

En la parte inferior del microscopio los electrones dispersados golpean una pantalla fluorescente, lo que da lugar a una "imagen de sombra" del objeto a estudiar, junto con sus diferentes partes mostradas en la oscuridad, la cual va a variar dependiendo de la densidad del objeto (Nobel, 2013).

2.8.4.5 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El microscopía Electrónica de Barrido (SEM) es un instrumento capaz de ofrecer un rango variado de información procedente de la superficie de la muestra. Su funcionamiento se basa en barrer un haz de electrones sobre un área del tamaño que deseemos (aumentos) mientras en un monitor se visualiza la información que hayamos seleccionado en función de los detectores que hayan disponibles (Tortora, Funke, & Case, 2007). Este microscopio se encuentra internamente equipado con unos detectores que recogen la energía y la transforman en imágenes y datos:

- a) Detector de electrones secundarios: (SEI- Secondary Electron Image) con las que se obtienen las imágenes de alta resolución.
- b) Detector de electrones retrodispersados: (BEI- Backscattered Electron Image) posee menor resolución pero mayor contraste para obtener topografía de la superficie.
- c) Detector de energía dispersiva: (EDS-Energy Dispersive Spectrometer) detecta los rayos X generados y permite realizar un análisis espectrográfico de la composición de la muestra.

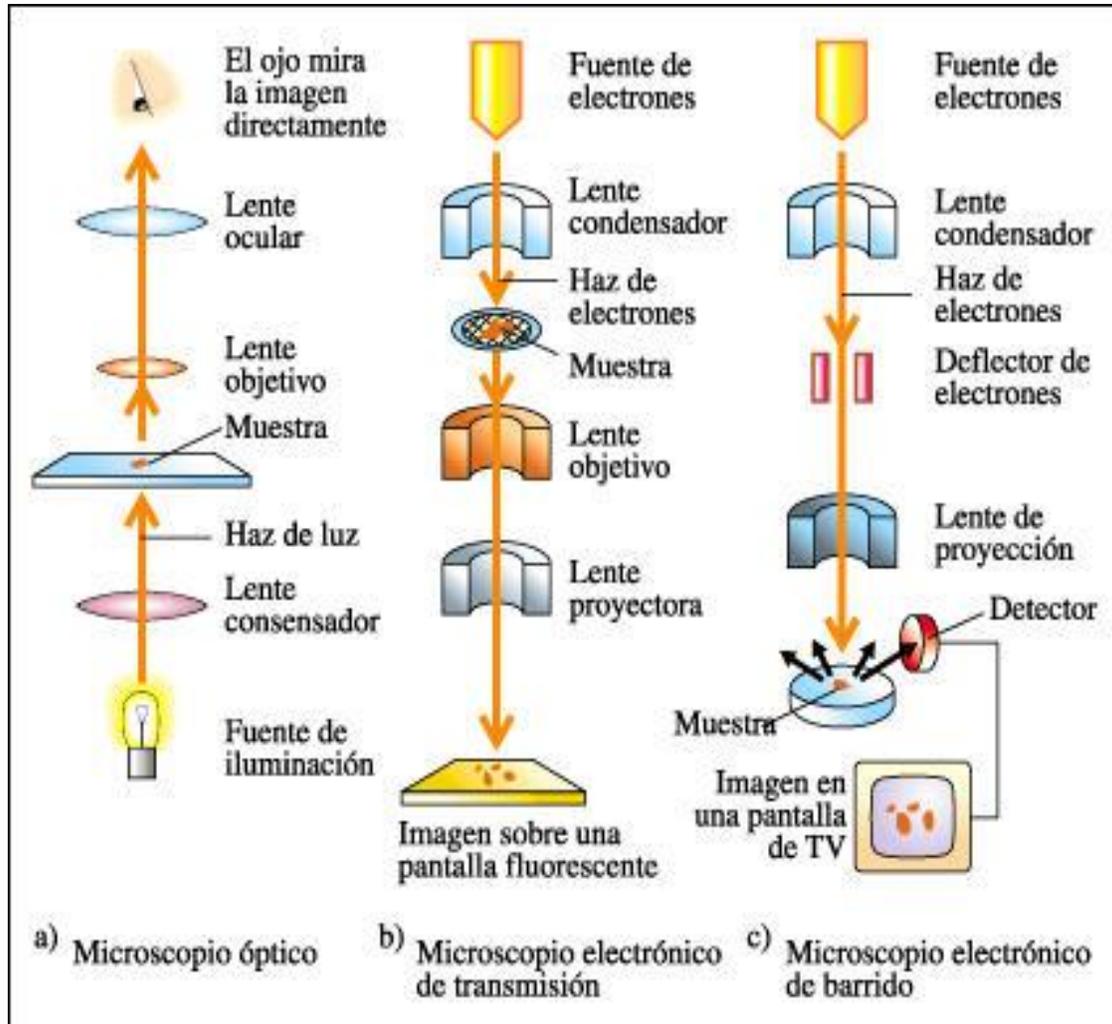


Fig. 15 Esquema de las principales diferencias entre el microscopio óptico, electrónico de transmisión y el de barrido (Curtis, 2006)

2.8.5 Nanopartículas de PECA

El cianoacrilato es generalmente una resina acrílica, que polimeriza rápidamente en presencia de agua formando cadenas largas y fuertes. Son líquidos incoloros y de baja viscosidad. A partir de este compuesto se pueden producir diversas nanopartículas como las de poliácilcianoacrilato (PACA), poli n-butil cianoacrilato y polietilcianoacrilato (PECA) (Hans & Lowman, 2002). Los cianoacrilatos de cadena corta sin embargo, no se degradan con facilidad y tienen alta toxicidad, mientras que los cianoacrilatos de cadena larga son menos tóxicos y tardan más en degradarse (González, 2012).

Son de las sustancias más utilizadas como vehículos de fármacos debido a que poseen propiedades moco-adhesivas, además de ser compatibles con una gran variedad de compuestos biológicamente activos. Entre sus características está que son biodegradables y

biocompatibles con muchos fármacos. PECA se prepara principalmente por polimerización en emulsión en presencia y ausencia de diferente peso molecular de poli etilenglicol (PEG), y se requiere usar Pluronic F68 como el estabilizador de las nanopartículas (Yordanov & Bedzhova, 2011).

2.8.6 Nanopartículas de SiO₂

Las nanopartículas de SiO₂ tienen amplias aplicaciones en la industria química como aditivo a drogas, cosméticos y en comida. Recientemente se han usado en el campo de la Biomedicina y la Biotecnología como biosensores y biomarcadores. Debido a esto se tiene un gran interés en el efecto sobre la salud humana y el medio ambiente (Fede, Selvestrel, Compagnin, Mognato, Mancin, Reddi, & Celotti, 2012).

Algunos estudios han demostrado tener efectos en la viabilidad celular y en la apoptosis ya que inducen la formación de ROS (sustancias reactivas de oxígeno), es decir inducen citotoxicidad al haber un estrés oxidativo. Esto en función al tamaño, la dosis y el tiempo de exposición que se tenga de la nanopartícula y de una manera dependiente del área de superficie en humanos ya que pueden ser transportadas pasivamente en las células (Mu et al., 2012).

También se ha demostrado que presentan una orientación de átomos superficiales de configuración tetraédrica con cada átomo de Si ligado a un grupo OH lo que favorece su producción mediante procesos como la hidrólisis en fase de vapor, procesos húmedos o con gel de sílice o sílice hidratado (Díaz, 2013)

2.8.7 Nanopartículas de Quitosán – GSH

Se ha demostrado que el quitosán es biocompatible, biodegradable y no tóxico y tiene propiedades de muco-adhesión para el establecimiento de interacciones electrostáticas con grupos sialicos de la mucina. El quitosán es un aminopolisacárido principalmente producido por la quitina, la cual es el segundo polímero de carbohidrato más abundante en la tierra y posee un peso molecular alto (Janes, Fresneau, Marazuela, Fabra, & Alonso, 2001).

Las nanopartículas de quitosán se han estudiado ampliamente debido a su capacidad de unirse a cationes en medios neutros o débilmente ácidos, esto debido a su alta capacidad hidrofóbica consecuencia de un largo número de grupos hidroxilos así como su estructura de cadenas poliméricas flexibles las cuales favorecen la formación de complejos con los

caciones. Como acarreadores de drogas las nanopartículas de quitosán mejoran el potencial y tiene la ventaja de controlar y liberar de forma lenta la droga lo cual provee mayor solubilidad y estabilidad mejorando la eficacia y reduciendo su toxicidad (Wang et al., 2011).

Debido a su tamaño son capaces de pasar por diversas barreras como la hematoencefalica. Como un producto natural, el quitosán es un buen adyuvante farmacéutico renovable con buena biocompatibilidad, siendo su mayor punto fuerte su potencial. Debido a que se usa para transportar una droga, la forma en que se degrada es importante, el quitosán es degradado por procesos químicos y catálisis de enzimas la cual va a depender de la disponibilidad de su grupo amino (Velasco-Rodríguez, V., et al., 2012). Sin embargo no es considerado como una molécula tóxica a menos que se incremente la densidad, lo que daría como resultado que también se incrementara la toxicidad ya que están estrechamente relacionadas.

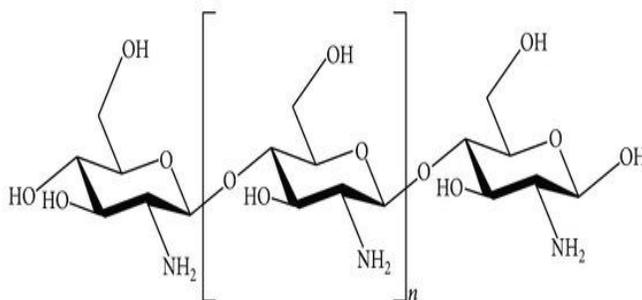


Fig. 16 Estructura química de la molécula de quitosán (Li, Min, Nan, Hode, Naylor, Chen, et al, 2013)

2.8.8 Antecedentes de las nanopartículas utilizadas

Las NP utilizadas en este trabajo fueron desarrolladas en el laboratorio 9 de Toxicología y Genética en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, donde se han caracterizado y preparado sistemas de nanopartículas de composición únicos e híbridos fabricados a base de dióxido de silicio (SiO₂) y polietilenoacrilato (PECA). Estos sistemas han sido evaluados acerca de su potencial citotóxico asociado al estrés oxidativo por otros integrantes del laboratorio.

De acuerdo a análisis realizados anteriormente mediante Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), tamaño de partícula y potencial Z, se determinó que el orden de adición durante la preparación de las nanopartículas contribuyen a que estas presenten diferentes características fisicoquímicas entre sí, y por lo tanto se vea reflejado en su potencial Z (Canudas, 2013).

Por otro lado citotoxicidad de estas nanopartículas fue demostrada *in vivo* con la estimación de especies reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS) en forma indirecta y concentración de glutatión reducido (GSH) en forma directa. Los resultados mostraron que hay un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes en las células, producido por la exposición de algunas NP (Canudas, 2013) específicamente las nanopartículas de PECA/SiO₂ en hígado a una dosis (1:10 en SSF) para GSH y para TBARS las nanopartículas de PECA/SiO₂ dosis (1:1 en SSF) en Riñón. También se encontró que al administrar dosis bajas se produce una menor respuesta del organismo sugiriendo que existe un efecto dosis respuesta.

En el análisis *in vitro* se encontró que las NP únicas son más tóxicas al producir una mayor cantidad de radicales libres y por lo tanto hacen que se activen los mecanismos de síntesis de GSH para disminuir el estrés oxidativo producido. Se estudió la viabilidad celular inducida por la exposición de las nanopartículas en la línea celular VERO (Riñón de mono verde africano) durante 4 horas, en donde se encontró que a dosis bajas hay mayor viabilidad a excepción del sistema PECA, mientras que a dosis altas solo el sistema híbrido SiO₂/PECA mostro viabilidad. Basándose en los resultados obtenidos se llegó a la conclusión de que los sistemas híbridos presentan mayor viabilidad en comparación con las nanopartículas únicas (Díaz, 2013).

También se evaluó el efecto genotóxico inducido por las nanopartículas mediante el ensayo cometa, el cual indico que los sistemas híbridos de 2.1 PECA/SiO₂ y 2.2 PECA/SiO₂ eran capaces de inducir genotoxicidad significativa, lo que se atribuye a las diferencias fisicoquímicas que posee cada sistema debido a las diferencias en cuanto a la forma de preparación. Estos sistemas híbridos mostraron producir mayor genotoxicidad que las nanopartículas únicas, de las cuales las NP de SiO₂ tuvieron el menor efecto tóxico (Piña, 2013).

A continuación se muestran los resultados obtenidos en la caracterización de los sistemas a base de PECA, SiO₂ y de Quitosán-GSH que estudiamos en este trabajo.

Nanopartícula	Control SiO ₂	Control PECA	Sistema 1 SiO ₂ /PECA	Sistema 2.1 PECA/SiO ₂	Sistema 2.2 PECA/SiO ₂
Potencial Z (mV)	-0.48	-4.27	-6.39	-0.766	-2.14
Tamaño de partícula (nm)	84% - 5.873 16% - 487.4	86.8% - 129.6 13.25% - 5.457	93% - 284.2 7% - 5.277	72.6% - 5.746 23.1% - 212.8	60.8% - 5.526 37.6% - 259.9
Promedio	6.482	63.95	198.2	9.519	10.36

Tabla 4 Caracterización de los sistemas de nanopartículas preparados a base de PECA y SiO₂

Nanopartículas	Quitosán-GSH 1	Quitosán-GSH 2
Potencial Z (mV)	182.2	196.6
Tamaño de partícula (nm)	64.55	65.37

Tabla 5 Caracterización de los sistemas nanoparticulados preparados a base de Quitosán-GSH

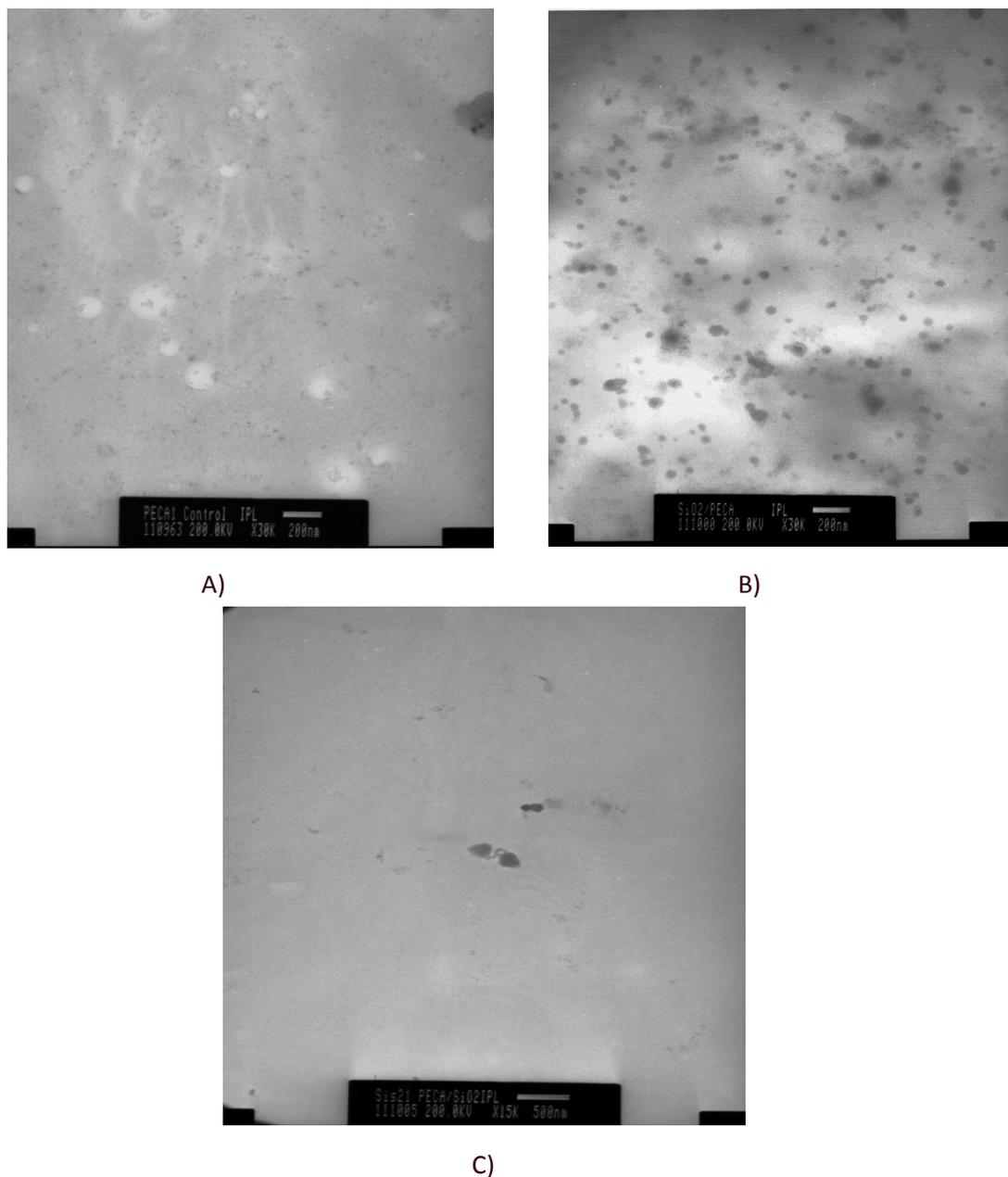


Fig. 17 Resultados de las micrografías de TEM para los diferentes sistemas nanoparticulados. (A) PECA, (B) SiO₂/PECA, (C) 2.1 PECA/SiO₂

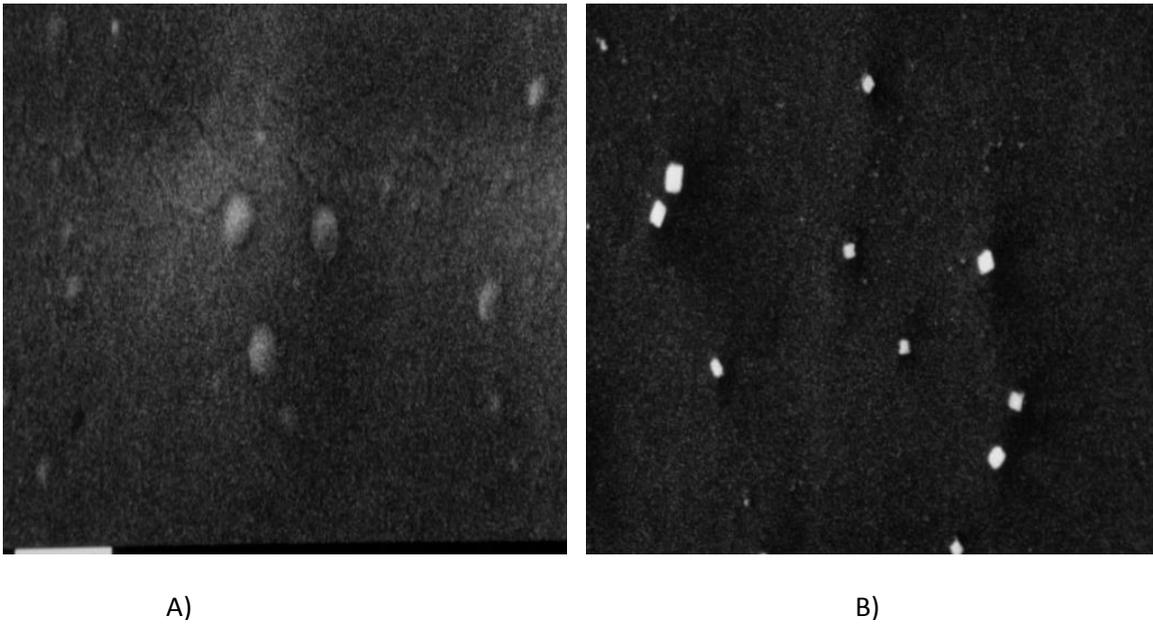


Fig.18 Resultados de las micrografías de SEM para los diferentes sistemas de nanopartículas. (A) SiO₂ y (B) PECA/SiO₂

3. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo y perspectivas de nanopartículas para uso terapéutico se ha incrementado en los últimos años, esto debido a que se requiere que los medicamentos sean más específicos, eficaces y con menos efectos adversos. Las nanopartículas pueden llegar a producir daños citotóxicos en diferentes grados. Uno de estos daños puede ser a nivel del Sistema Ubiquitina-Proteosoma, por lo que es importante evaluar el efecto que la exposición a las nanopartículas puede llegar a producirle en su funcionamiento. Por lo que es importante estudiar los efectos sobre la actividad similar a quimotripsina y la actividad de enzimas deubiquitinizantes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto tóxico asociado a la exposición de hepatocitos de ratón (células AML-12) en sistemas nanoparticulados fabricados a base de dióxido de silicio (SiO₂), polietilenoacrilato (PECA) y Quitosán-GSH sobre la actividad proteosomal y función de enzimas deubiquitinizantes.

4.2 Objetivos Particulares

- Evaluar el efecto producido por las nanopartículas de SiO₂, PECA y Quitosán-GSH sobre la actividad similar a quimotripsina del proteosoma, mediante ensayos fluorogénicos específicos.

- Evaluar el efecto producido por las nanopartículas de SiO₂, PECA y Quitosán-GSH sobre la actividad de las enzimas deubiquitinizantes mediante un ensayo de hidrólisis fluorogénica específica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos y soluciones

5.1.1 Cultivo celular

- Línea celular AML-12 ATCC CRL-2254TM (Hígado de ratón)
- Advanced DMEM (Dilbecco's Modified Eagle Medium) 1X (GIBCO)
- L-Glutamine 200 mM 100X (GIBCO)
- Pen/Strep (Penicilin Streptomycin) (GIBCO)
- Suero Fetal Bovino (GIBCO)
- Solución de tripsina al 0.25% (*In vitro*)
- PBS a pH de 7.4
 - Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄, 99.2%) (J. T. Baker)
 - Fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄, 99.3%) (J. T. Baker)
 - Cloruro de sodio (NaCl, 99.5%) (J. T. Baker)
 - Cloruro de potasio (KCl, 100%) (J. T. Baker)

5.1.2 Controles y sistemas de nanopartículas

- Sistema Control (Células sin exposición a las NP)
- Sistema PECA (Ácido acético al 1%, Pluronic F-68, Polietilcianoacrilato)
- Sistema SiO₂ (Ácido acético al 1%, Pluronic F-68 y SiO₂)
- Sistema SiO₂/PECA (Ácido acético al 1%, Pluronic F-68, SiO₂ y Polietilcianoacrilato)
- Sistema 2,1 PECA/SiO₂ (Ácido acético al 1%, Pluronic F-68, Polietilcianoacrilato, SiO₂) con mayor tiempo de agitación al prepararse
- Sistema 2,2 PECA/SiO₂ (Ácido acético al 1%, Pluronic F-68, Polietilcianoacrilato, SiO₂)
- Sistema de Quitosán-GSH dosis 0.0385 eq a (1.0515 μmol de GSH)
- Sistema de Quitosán-GSH dosis 0.00385 eq a (0.10515 μmol de GSH) (1:10, en SSF)
- Solución salina fisiológica
 - Cloruro de sodio al 9%. (NaCl, 99.5%) (Prod. Quim. Monterrey)
- Peróxido de hidrogeno 30 μM (J.T. Baker)
- Buthionine-S, R- sulfoximine (BSO) (MP Biomedical) a 100 μM
- MG 132 (C₂₆H₄₁N₃O₅) (Tocris biocience) en 100 mM de DMSO

5.1.3 Cosecha de células

- PBS a pH de 7.4
 - Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄, 99.2%) (J. T. Baker)
 - Fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄, 99.3%) (J. T. Baker)
 - Cloruro de sodio (NaCl, 99.5%) (J. T. Baker)
 - Cloruro de potasio (KCl, 100%) (J. T. Baker)
- Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (C₇H₇FO₂S, 99%) (Sigma-Aldrich)
- 2-propanol, (C₃H₈O, 99%) (Sigma-Aldrich)
- EDTA (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈*2H₂O) (J. T. Baker)
- Triton X100 (MP Biomedical)

5.1.4 Cuantificación de proteínas totales

- Albumina Sérica Bovina (BSA) Molecular Biology Tested (Sigma-Aldrich), stock de 1 mg/ml
- Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BIO RAD) (dilución 1:3)

5.1.5 Determinación de la actividad proteosomal similar a quimotripsina

- Buffer de actividad proteosomal
 - Tris HCl pH 7.5, 50 mM (CH₂OH)₃(NH₂*HCl, 99.7%) (USB)
 - Cloruro de sodio (NaCl, 99.5%), 150 mM (Prod. Quim. Monterrey)
 - EDTA 0.5 mM (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈.2 H₂O₂) (J. T. Baker)
 - Nonidet p 40 nonidet 0.5 % (Fluka Biochemika)
 - Albumina Sérica Bovina Molecular Biology Tested, stock 5 mg/ml (Sigma-Aldrich)
 - Sustrato Suc-Leu-Tyr-AMC (Suc-LY-AMC) (C₂₉H₃₃N₃O₈) disuelto en DMSO (BostonBiochem). Stock concentración de 10µM

5.1.6 Evaluación de la actividad de enzimas deubiquitinizantes

- Buffer de actividad de enzimas deubiquitinizantes a pH 7.5
 - HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonic acid) (C₈H₁₈N₂O₄S), 50mM
 - EDTA 0.5 mM (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈.2 H₂O₂) (J. T. Baker)
 - Ovoalbumina 0.1 mg/ml
 - DTT (Dithiothreitol) (BIO RAD) 1 mM

- Sustrato Ubiquitin 7-amino-4-metilcumarina (Ubiquitina-AMC) en 100% DMSO (BostonBiochem), stock 250 µM
- Ubiquitin c-terminal hydrolase L3 (UCH-L3) en HEPES pH 8, 1mM de DTT (BostonBiochem), stock de 48.5 µM

5.2 Aparatos y Equipos

- Campana de flujo laminar modelo CFV-90, (INDUSTRIAS FIGURSA)
- Fluorómetro (BIO RAD VERSA FLUOR TM FLUOROMETER)
- Potenciómetro (OAKTON pH 510 SERIES pH/MV/C METER)
- Incubadora para cultivos celulares (Shel Lab CO₂ incubator)
- Microcentrifuga con control de temperatura (Microfuge 22R Centrifuge Beckman Coulter)
- Lector de placa (Mrc Scientific Instruments)

5.3 Metodología

5.3.1 Mantenimiento del Cultivo celular

Un cultivo celular implica el aislamiento o la dispersión de células de órganos y tejidos y su mantenimiento *in vitro*. En general las células mantenidas en un cultivo celular conservan todas las características genéticas y capacidades funcionales comparables del organismo vivo. Para permitir la supervivencia y el funcionamiento normal de células cultivadas, la temperatura 37°C, el pH, la fuerza iónica y el acceso a nutrientes esenciales deben simular lo más cerca posible las condiciones dentro de un organismo intacto (Passarge, 2009). Sin embargo, los datos obtenidos solo indican una tendencia en cuanto el efecto real que se pueda causar en células de un organismo vivo.

En un ambiente estéril se colocó en una caja petri grande 6 ml de medio DMEM Advanced (previamente suplementado al 4 % con SFB, 1% de penicilina/estreptolisina y 1% glutatión) y se agregó gota a gota la suspensión de células de la línea celular AML-12. Posteriormente se incubó a una temperatura de 37°C, 5% de CO₂ y 90 de humedad relativa. Aproximadamente a las 48 horas dependiendo del estado de confluencia de las células se prosiguió a lo siguiente:

- En caso de que no se encontrara entre 90-95% de confluencia, solo se realizaba un lavado con PBS y se agregaba 6 ml de medio para luego volver a incubar.
- Si se encontraban entre el 90-95% de confluencia se realizaban dos lavados con

PBS y se agregaba 2.5 ml de tripsina con el objeto de obtener una suspensión celular. Posteriormente se centrifugaba la suspensión obtenida a 1500 rpm y se resuspendía el botón obtenido para realizar subcultivos en cajas petri de 6 pozos.

5.3.2 Exposición a las nanopartículas

Una vez que las células se encontraban 90-95% de confluencia:

- Para los sistemas de PECA y SiO₂, se realizó un lavado con PBS, se agregó 100 µl de cada sistema por cada 1 ml de medio, y se dejó incubar por 4 horas.
- Para los sistemas de Quitosán-GSH se lavaron las células con PBS, se agregó 50 µl de nanopartículas por cada 1ml de medio y se dejó incubar por 2 horas.

Una vez transcurrido el tiempo se colocaron las muestras en hielo, se lavaron con PBS frío y se rasuraron, se centrífugo la suspensión obtenida (1200 rpm x 5 min), y al botón se le agrego 150µL de PBS/detergente para luego congelar las muestras. Posteriormente se llevó a cabo una ruptura mecánica usando una jeringa para luego centrifugar las muestras (10 min x 1500 rpm), separando el sobrenadante y desechando el botón (Canudas, 2013).

Las concentraciones de las nanopartículas fueron las siguientes.

Nanopartículas	Control SiO ₂	Control PECA	Sistema 1 SiO ₂ /PECA	Sistema 2.1 PECA/SiO ₂	Sistema 2.2 PECA/SiO ₂
mg de nanopartículas/ml	5.6167	4.8500	5.7333	9.0500	6.8000
mg en 100 µl	0.5617	0.4850	0.5733	0.9050	0.68

Tabla 6 Concentraciones de las nanopartículas de PECA y SiO₂ agregadas a los cultivos celulares

Nanopartículas	Quitosán-GSH 1	Quitosán-GSH 2
g de nanopartículas/ml	0.77 eq a (21.03 µmol de GSH)	0.077 eq a (2.103 µmol de GSH)
g en 50 µl	0.0385 eq a (1.0515 µmol de GSH)	0.00385 eq a (0.10515 µmol de GSH)

Tabla 7 Concentraciones de las nanopartículas de Quitosán-GSH agregadas a los cultivos celulares

5.3.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

El método de Bradford es un método espectrofotométrico para la cuantificación de la concentración de proteínas. Se basa en la unión del colorante, el azul de Coomassie G250 a los aminoácidos básicos presentes en las proteínas, lo que origina que se forme un compuesto de color azul que se absorbe a 595 nm. Posteriormente para determinar la concentración final se procede a realizar una curva patrón utilizando como stock BSA (Gasca, Z. 2011). Este método posee bajo límite de detección, es compatible con agentes reductores, es rápido de realizar, hay pocas sustancias que causen interferencias y es bajo en costos por lo que se prefirió su uso al de otras técnicas.

Una vez transcurridas 24 hrs de haber congelado las muestras se prosiguió a determinar la cantidad de proteínas que contenían para lo cual se realizó todo en frío.

- Se agregaron 5 µl de la muestra en 195 µl de la solución de (1:3 Reactivo de Bradford y agua desionizada).
- Se dejó reposar por 15 min y luego se prosiguió a realizar la lectura en un espectrofotómetro UV/visible a 595 nm.
- Para poder determinar la cantidad total de proteínas se realizó previamente una curva estándar utilizando BSA a una concentración de 1 mg/ml.

Vol. De sol. Stock de BSA(µl) A	PBS (µl) B	Alícuota (µl de las soluciones A+B)	Solución diluida de Bradford (µl)	Proteínas (µg/ml)
0	1000	40	160	0
40	920	40	160	16
50	900	40	160	20
60	880	40	160	24
70	860	40	160	28
80	840	40	160	32
90	820	40	160	36
100	800	40	160	40

Tabla 8 Volúmenes requeridos de BSA y PBS para la preparación de la curva estándar de proteínas totales por el método de Bradford

5.3.4 Determinación de la actividad proteosomal similar a quimotripsina

Una vez determinada la concentración de proteínas se prosiguió con los siguientes pasos:

- Por cada 42 μ l del sustrato Suc-LY-AMC en 100% DMSO (10 μ M) se agregaron 10 ml del Buffer de Actividad proteosomal.
- Posteriormente se calcularon los μ l que se requerían de cada muestra de los lisados para tener 100 μ g de proteína.
- En el caso del blanco se agregaron 20 μ l de albumina (5 mg/ml) y 980 μ l de buffer de actividad proteosomal+ Suc-LY-AMC (10 μ M), siempre trabajando en el cuarto oscuro.
- Para las muestras se agregó 1 ml de buffer de actividad proteosomal + Suc-LY-AMC (10 μ M), y los μ l equivalentes a 100 μ g de proteína previamente calculados.
- Luego se dejó incubar a 37 °C por 30 min

Una vez transcurridos los 30 min, se realizó la lectura en el fluorómetro, en caso de no realizarlo, inmediatamente se colocaban las muestras en hielo para detener la reacción. Los filtros utilizados fueron de λ 380 de excitación y λ 460 de emisión (Castro, 2008).

5.3.5 Determinación de la actividad de enzimas deubiquitinizantes

La actividad de las enzimas deubiquitinizantes puede medirse a partir del sustrato Ub-AMC el cual al ser hidrolizado por estas enzimas, produce la liberación de fluorescencia.

- Se preparó el buffer de acuerdo a las cantidades anteriormente indicadas y para el caso de la ovalbumina se utilizó una clara de huevo, para la cual se agregaron 5 ml de H₂O desionizada + 500 μ l de clara, se determinó la concentración de proteínas y se midieron los μ l necesarios para una concentración de 0.1 mg/ml de ovalbumina.
- Una vez preparado el buffer se agregó por cada 100 μ l de este, 0.08 μ l del sustrato Ubiquitina-AMC (0.2 μ M)
- Además calculamos los μ l de la muestra que equivalía a 25 μ g de proteínas.
- Posteriormente se agregaron los μ l de buffer + Ubiquitina-AMC que eran necesarios para completar un volumen de 100 μ l y para el blanco solo se agregó buffer+Ubiquitina-AMC (0.2 μ M).
- Luego se colocaron en un tubo eppendorf ámbar, y se dejó en incubación a una temperatura de 30°C +/- 0.2 °C/ por 30 min.
- Después de que la reacción llegó a un equilibrio térmico, se colocó en hielo.
- La reacción se observó con un incremento de la fluorescencia en un espectro de emisión de 460 nm (λ_{ex} =380 nm) (Dang, Melandri & Stein, 1998).

6. ANALISIS DE RESULTADOS

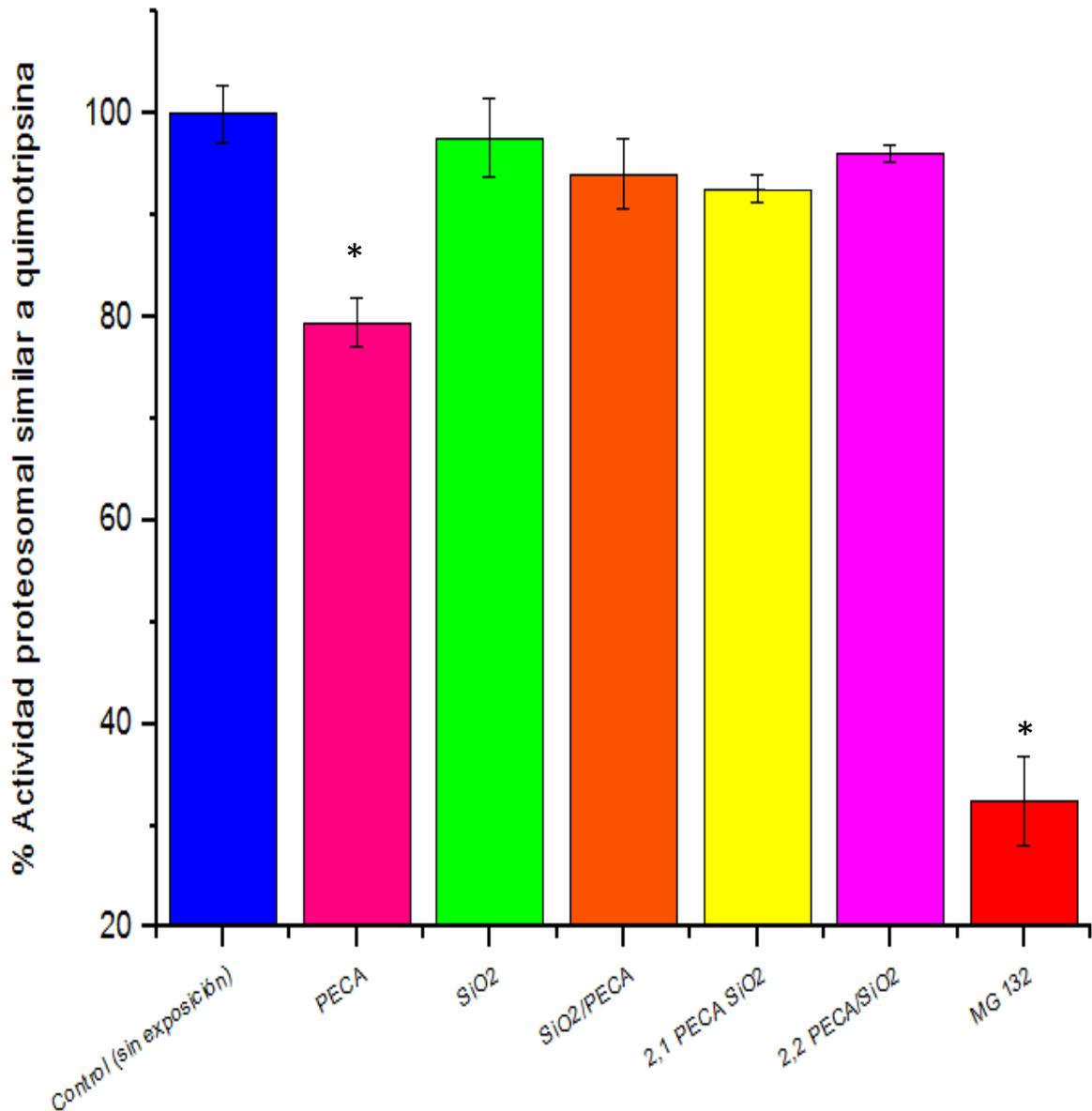
El Sistema Ubiquitina-Proteosoma es el principal mecanismo de degradación de proteínas, por lo que alguna modificación en su función trae consigo alteraciones como el incremento o decremento de la cantidad de proteínas que deben de ser degradadas, así mismo parte de la regulación de este sistema lo llevan a cabo las enzimas deubiquitinizantes, las cuales se encargan de hidrolizar moléculas de ubiquitina de las proteínas diana.

En el caso de algunas enfermedades la disminución o aumento en la concentración de algunas proteínas específicas puede ser de gran utilidad, por lo que se planteó hace ya muchos años la utilización de NPs en la producción de medicamentos. Como tal la Nanotecnología es la ciencia que se encarga de estudiar todos los aspectos asociados con la producción de nanopartículas, y de manera más específica la Nanotoxicología se encarga de estudiar los efectos tóxicos asociados a éstas.

Dado que su uso en Farmacología es principalmente como acarreador de fármacos es importante analizar todos los efectos que se puedan tener en el organismo, ya que al ser agentes externos es posible que produzcan un efecto tóxico y en consecuencia modificar algunas funciones celulares.

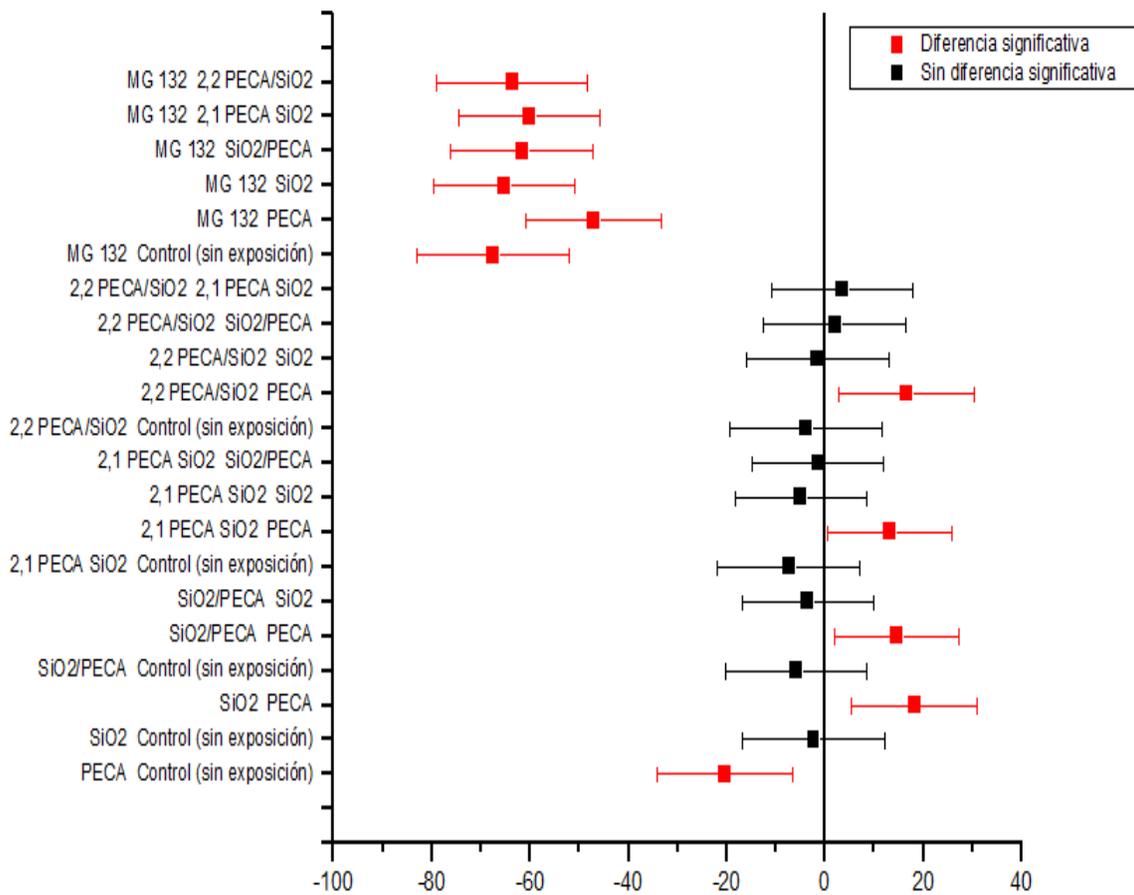
Las nanopartículas producidas a base de PECA y SiO₂ se han estudiado con anterioridad, los datos obtenidos en cuando a la prueba de MTT, GSH, caracterización entre otras, indican que hay cierta toxicidad asociada principalmente a los sistemas híbridos y a las nanopartículas de PECA (Piña, 2013; Canudas, 2013; Díaz, 2013).

Al realizar el análisis ANOVA y la prueba múltiple de rango (Tukey) de la evaluación de la actividad proteosomal similar a quimotripsina de los diversos sistemas de nanopartículas se encontró, que los sistemas que disminuían más la actividad eran los sistema de PECA y el sistema híbrido 2.1 PECA/SiO₂ (Grafica 1), sin embargo en el caso del sistema híbrido 2.1 PECA/SiO₂ al realizar la prueba de Tukey no se encontraron diferencias significativas respecto al control (Grafica 2) lo que puede indicar que hay una disminución de la actividad sin llegar a un efecto tóxico significativo.



Grafica 1 Comparación del porcentaje de actividad proteosomal similar a quimotripsina en células expuestas a diversos sistemas nanoparticulados preparados a base de PECA y SiO₂, el inhibidor del proteosoma MG132 y el control (células no expuestas). Las barras marcadas (*) indican que hay diferencias significativas entre las medias correspondientes $p < 0.05$.

Prueba Tukey para los sistemas nanoparticulados de PECA y SiO₂



Grafica 2 Análisis estadístico de comparación mediante la prueba de Tukey de la actividad proteosomal similar a quimotripsina en el que se muestran las diferencias estadísticas significativas entre las medias correspondientes $p < 0.05\%$ de los sistemas nanoparticulados preparados a base de PECA y SiO₂, el inhibidor del proteosoma MG 132 y el control (células no expuestas).

El efecto de la exposición de sistemas nanoparticulados sobre la función del proteosoma no se ha profundizado lo suficiente, pero si se han realizado estudios con otro tipo de nanopartículas óxido metálicas donde se encontró que características como son el tamaño de partículas, carga, concentración y tiempo de exposición favorecerían la formación de uniones peptídicas de las nanopartículas a subunidades del proteosoma, estas interacciones dependen de las características fisicoquímicas de cada nanopartícula y están asociadas a la disminución de su funcionalidad, sin embargo no se sabe con claridad cómo es que ocurre este mecanismo (Falaschetti, Paunesku, Kurepa, Nanavati, Chou, Song, & Woloschak, 2013).

En el caso de los sistemas analizados, la disminución de la actividad proteosomal también puede estar asociada al hecho de que las nanopartículas modulan el estado óxido-reducción intracelular de manera directa o indirecta mediante la formación de radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que induce modificaciones en la función de proteínas como las estudiadas en este trabajo, las cuales son sensibles a cambios en el estado redox celular. (Yordanov & Bedzhova, 2011).

Estudios realizados en la línea celular HaCat (línea celular derivada de queratinocitos humanos) (Yang et al., 2010) demostró que la exposición de nanopartículas de SiO₂ durante 24 hrs a una dosis de 0.01mg/ml, produce la disminución de la expresión de por lo menos 16 proteínas como son la peroxirredoxinas y la tioredoxina (proteínas asociadas al estrés oxidativo) y como consecuencia la reducción de la capacidad antioxidante de la célula lo que favorece el estrés oxidativo y la citotoxicidad. En el caso del sistema que manejamos la dosis fue de 5.5 mg/ml por 2 horas, sin embargo cabe la posibilidad de que las interacciones que se lleven a cabo sean similares debido a que la composición de las nanopartículas es la misma.

Como consecuencia del incremento de especies reactivas de oxígeno hay un estado de desequilibrio donde se produce la oxidación de moléculas como lípidos y proteínas en la membrana celular. La oxidación de las moléculas que conforman la membrana altera su permeabilidad, lo que conduce a una pérdida del equilibrio osmótico de la célula, todo lo anterior produce un desequilibrio electrolítico, con aumento en la liberación de calcio y la producción de óxido nítrico lo que produce el estrés oxidativo y la muerte celular (Angoa, 2007).

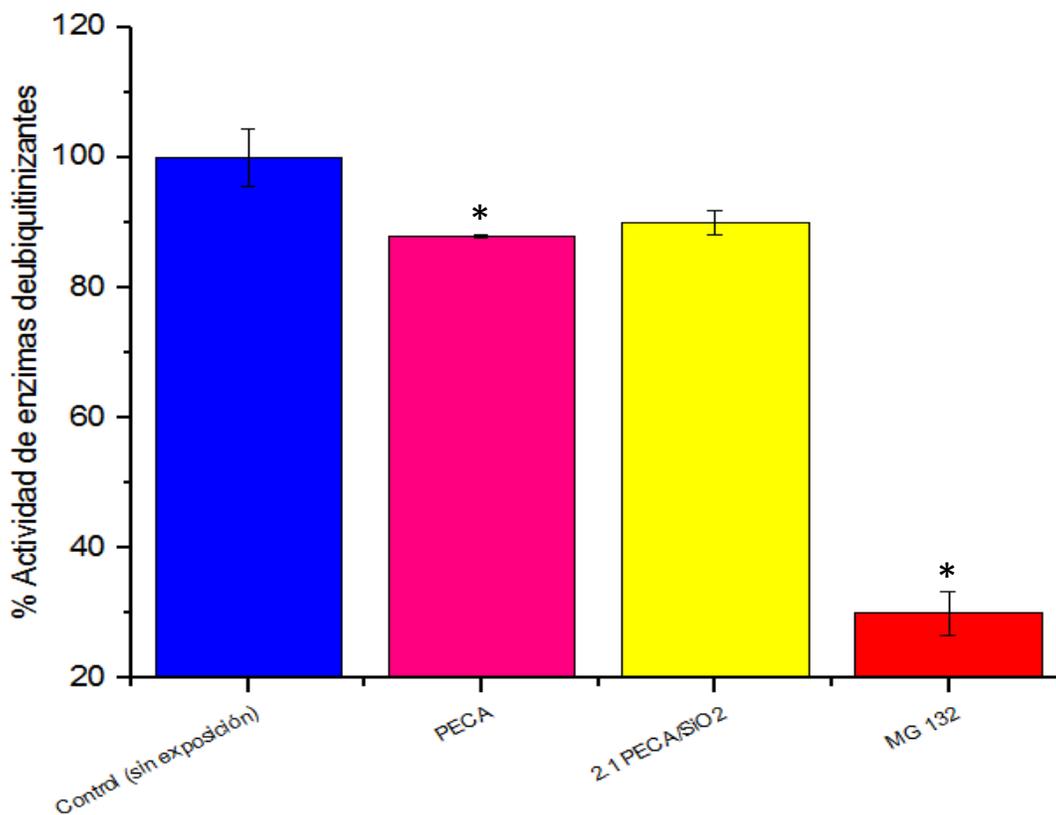
El Sistema Ubiquitina-Proteosoma aumenta su actividad sobre proteínas específicas en cualquier circunstancia en la que se requiera reparar daños celulares. Por lo tanto podría ocurrir que al exponer las células a los diversos sistemas, y éstos a su vez producir radicales libres y ROS, su actividad aumentara.

Sin embargo, los resultados indican que en todos los sistemas la función se vio disminuida, existen autores que declaran haber encontrado disminuciones transitorias de la función de este sistema durante un incremento en el estrés oxidativo y lo fundamentan a través de la unión del nonenal, un producto de la peroxidación lipídica a las subunidades proteicas de los proteosomas impidiendo su procesamiento y dando lugar a una acumulación (Tomey, Vicedo A., Ortega, 2000). Esta acumulación junto con la precipitación de proteínas oxidadas incrementan el daño oxidativo y favorecen que el proteosoma siga sin funcionar de forma correcta (Pickering, Andrew M., Davies, 2013). Consideramos que será interesante estudiar para el caso de las nanopartículas de interés en

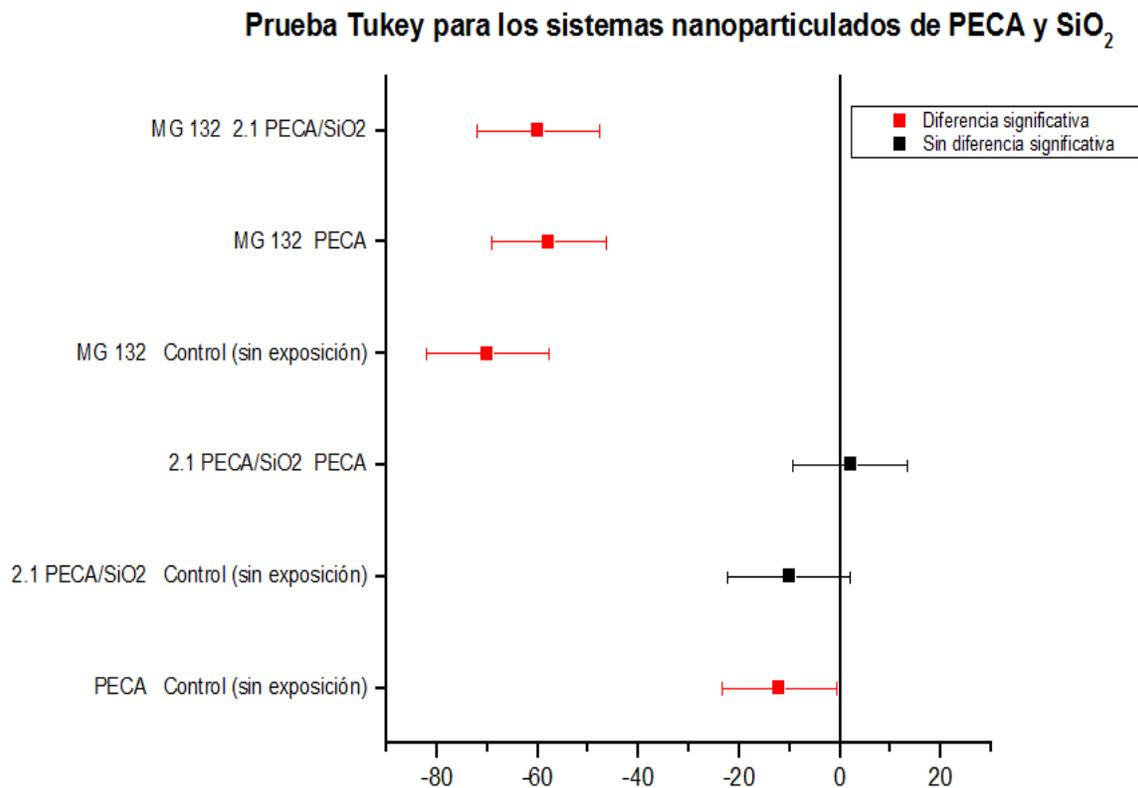
este trabajo los efectos inducidos al Sistema Ubiquitina-Proteosoma en relación al tiempo de exposición y la dosis-dependencia.

En el caso de la actividad de enzimas deubiquitinizantes, dado los resultados obtenidos en la actividad proteosoma similar a quimotripsina, solo se analizaron los sistemas de PECA y 2.1 PECA/SiO₂ (Gráfica 3 y 4). Al hacer el análisis estadístico mediante la prueba comparativa de Tukey se obtuvo que el sistema 2.1PECA/SiO₂ no tuvo diferencias significativas respecto al control, mientras que el sistema de PECA sí las tiene.

En este caso cabe la posibilidad de que el efecto en estas enzimas puede estar asociada directamente con la producción de radicales libres debido a las nanopartículas. Hay evidencias que sugieren que las enzimas deubiquitinizantes pueden ser inhibidas de forma reversible por ROS a través de la oxidación del residuo catalítico de cisteína y por lo tanto su actividad se va a ver reducida (Cotto-Rios, 2013).



Gráfica 3 Comparación del porcentaje de actividad de enzimas deubiquitinizantes en células expuestas a los sistemas nanoparticulados preparados a base de PECA y 2.1 PECA/SiO₂, el inhibidor del proteosoma MG132 y el control (células no expuestas). Las barras con (*) indican que hay diferencias significativas entre las medias correspondientes $p < 0.05\%$.



Grafica 4 Análisis estadístico de comparación mediante la prueba de Tukey de la actividad de enzimas deubiquitinizantes en el que se muestran las diferencias estadísticas significativas entre las medias correspondientes $p < 0.05\%$ de los sistemas nanoparticulados preparados a base de PECA y 2.1 PECA/SiO₂, el inhibidor del proteosoma MG 132 y el control (células no expuestas).

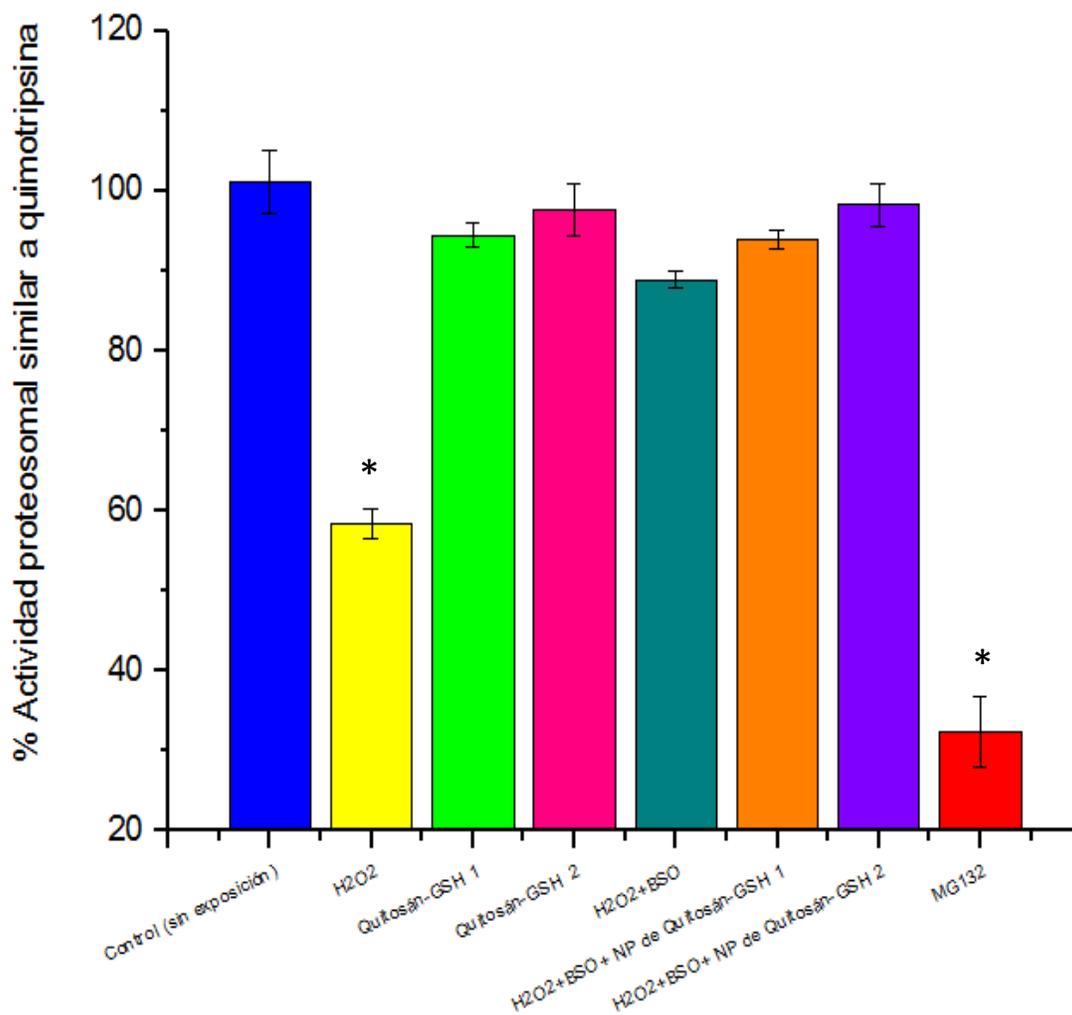
En el caso de las nanopartículas preparada a base de Quitosán-GSH, nuestro interés no solo radicaba en conocer los efectos sobre la actividad similar a quimotripsina del proteosoma y la actividad de enzimas deubiquitinizantes, si no también evaluar si el glutatión contenido en las nanopartículas, podía contribuir a modificar la respuesta celular al modular el estrés oxidativo inducido por agentes estresores celulares como el peróxido de hidrógeno y las nanopartículas. .

En la gráfica 5 se puede observar lo siguiente:

- Se tiene un control que son células las cuales no fueron expuestas a nanopartículas, ni sometidas a ningún tipo de estrés oxidativo
- En el siguiente sistema a las células se les agrego únicamente H₂O₂ a una concentración de 30 μ M para someterlas a un estrés oxidativo
- Los siguientes dos sistemas consisten en las nanopartículas en dosis de 0.0385 g/ml (Equivalente a 1.0515 μ mol de GSH) y dosis de 0.00385 g/ml

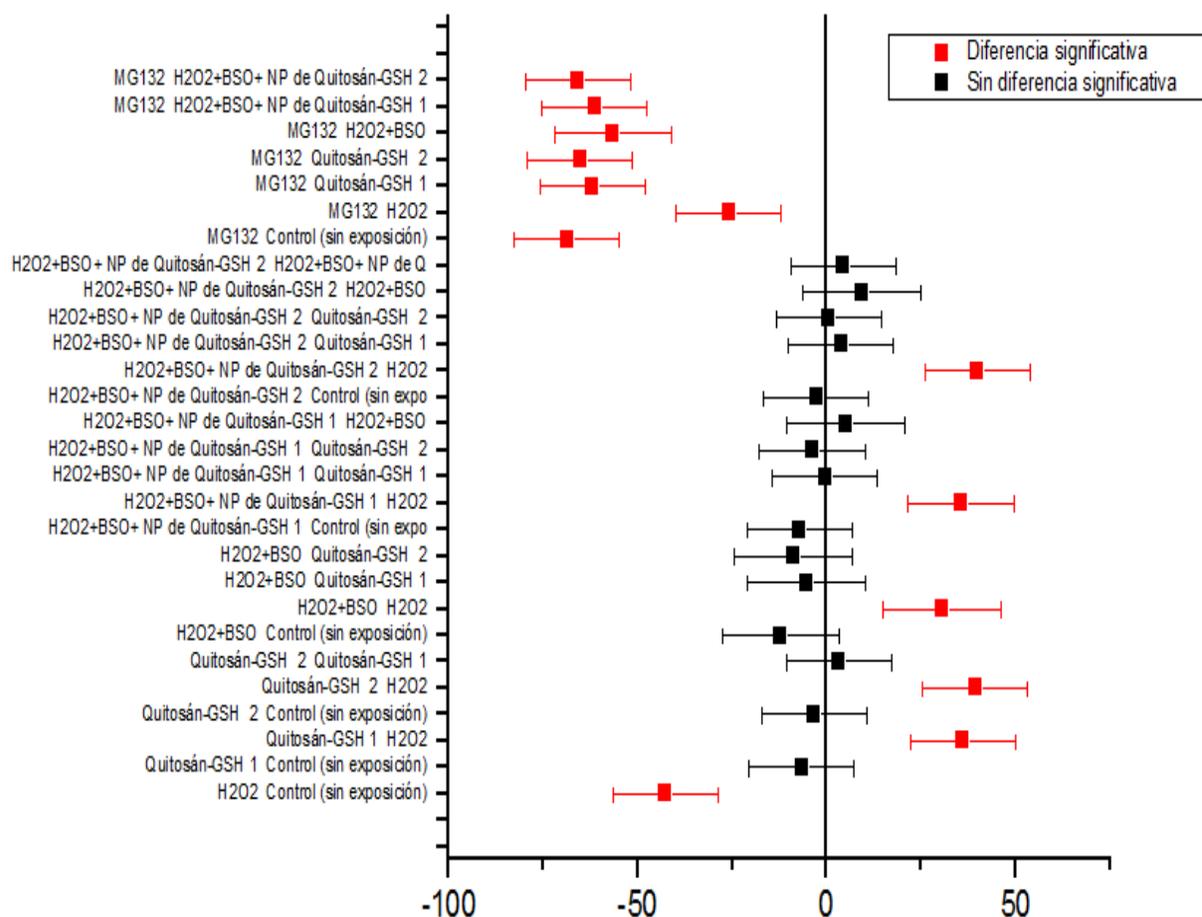
(Equivalente a 0.10515 μ mol de GSH) sin someterlas a ningún estrés oxidativo.

- ➔ A las células del quinto sistema se les agregó una concentración de H₂O₂ a 30 μ M, posteriormente transcurridas dos horas se agregó el BSO a una concentración de 100 μ M, esta sustancia inhibe la síntesis de la gamma-glutamilcisteina-sintetasa, la cual es requerida para la biosíntesis del glutatión.
- ➔ Los siguientes dos sistemas están conformados por lo mismo que el sistema 5 más aparte las nanopartículas en dosis 0.0385 g/ml (Equivalente a 1.0515 μ mol de GSH) y dosis 0.00385 g/ml (Equivalente a 0.10515 μ mol de GSH)
- ➔ Por último el inhibidor del proteosoma el MG 132



Gráfica 5 Comparación del porcentaje de actividad proteosomal similar a quimotripsina de células expuestas a diversos sistemas nanoparticulados preparados a base de Quitosán-GSH (Quitosán-GSH1 es la dosis alta y Quitosán-GSH 2 es la dosis baja), células expuestas a H₂O₂, el inhibidor del proteosoma MG132 y el control (células no expuestas). Las barras con (*) indican que hay diferencias significativas entre las medias correspondientes $p < 0.05\%$.

Prueba Tukey para los sistemas nanoparticulados de Quitosán-GSH



Grafica 6 Análisis estadístico de comparación mediante la prueba de Tukey de la actividad proteosomal similar a quimotripsina en el que se muestran las diferencias estadísticas significativas entre las medias correspondientes $p < 0.05\%$ de los sistemas nanoparticulados preparados a base de Quitosán-GSH, el inhibidor del proteosoma MG 132, células expuestas a H₂O₂ y el control (células no expuestas).

Al analizar los resultados mediante la prueba estadística de comparación de Tukey (Gráfico 6) los sistemas que contenían nanopartículas no mostraron tener diferencias significativas respecto al control (células no expuestas). Sin embargo en la representación gráfica se puede apreciar tres puntos importantes:

La primera es que entre los sistemas de nanopartículas, el sistema de Quitosán-GSH 1 reduce más la actividad similar a quimotripsina del proteosoma en comparación al sistema de Quitosán-GSH.2, esto puede ser debido a que las NP Quitosán-GSH.1 tiene mayor concentración y por lo tanto la producción de ROS y radicales libres es mayor, mientras que en las últimas nanopartículas es menor al estar en una solución diluida.

La segunda es que en el sistema 5 a pesar de tener un inhibidor de la síntesis del glutatión, no presentó diferencias significativas respecto al control (células no expuestas). Lo que sugiere que el tiempo de exposición no fue el suficiente. De acuerdo a estudios realizados, el tiempo de exposición del BSO cercano a 2 horas no muestra niveles significativos de la reducción de glutatión, mientras que tiempos prolongados de hasta 8 horas muestran una disminución más significativa de este compuesto (Sekine et al., 2012).

Por último tenemos que los sistemas 6 y 7 fueron sometidos a un estrés oxidativo, a estos sistemas se les agregó las nanopartículas en dosis de 0.0385 g/ml (Equivalente a 1.0515 μ mol de GSH) y dosis de 0.00385 g/ml (Equivalente a 0.10515 μ mol de GSH), y de acuerdo a los resultados, se puede apreciar que hubo una modulación del equilibrio posiblemente oxido-redox. Estos sistemas no mostraron tener diferencias significativas respecto al control (células no expuestas) por lo tanto puede considerarse que reducen la actividad del proteosoma pero sin llegar a un efecto tóxico.

El glutatión siendo el principal agente antioxidante celular puede modular las señales celulares bajo un estrés oxidativo, protege a las células contra toxinas exógenas y endógenas incluyendo ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS), mediante la reducción no enzimática, mientras que la eliminación de hidroperóxidos requiere de la enzima glutatión peroxidasa. Estas dos reacciones generan el glutatión oxidado (GSSG), el cual se vuelve a reducir a GSH por la glutatión reductasa que usa NADPH del ciclo de las pentosas fosfato.

Posiblemente el glutatión presente en las nanopartículas, actuó como agente antioxidante reduciendo el estrés oxidativo (ya reportados en trabajos previos para algunas de las nanopartículas estudiadas en este trabajo) y por lo tanto el proteosoma pudo actuar de forma normal mediante la degradación de proteínas al no haber una alta concentración de sustancias reactivas que inhibieran su función. El mecanismo por el cual el proteosoma puede hidrolizar proteínas dañadas se desconoce, pero se piensa que puede ser por el reconocimiento de compuestos hidrofóbicos expuestos después de las modificaciones producidas por el estrés oxidativo, reconocimiento de marcadores como aminoácidos oxidados y cambios conformacionales de proteínas dañadas (Jung & Grune, 2008).

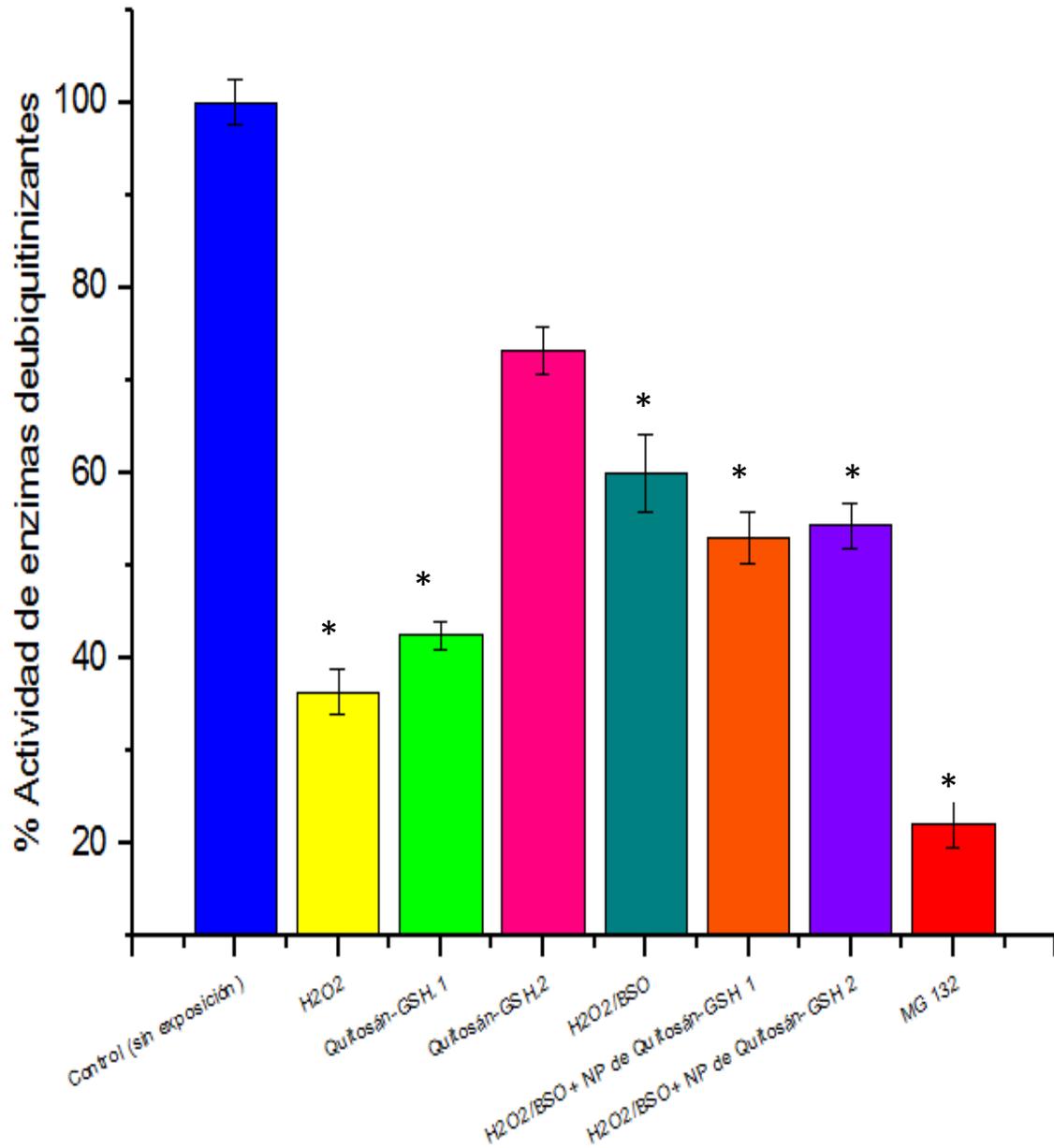
Otra posibilidad puede ser el hecho de que diversos estudios han demostrado que la oxidación puede alterar a la ubiquitinación. Las enzimas E1 y E2 son reguladas mediante el estado redox de la célula. Estas enzimas contienen sitios activos con residuos sulfhidrilos los cuales deben permanecer en estado reducido para que estas enzimas estén activas. La exposición a agentes oxidantes producen que el agente reductor GSH disminuya y los niveles de los productos oxidados como GSSG incrementan. Al incrementar se favorece la

formación de E1-SSG y E-SSG que son las formas oxidadas de estas enzimas y además son su forma inactiva (Jahngen-Hodge, 1997).

En este trabajo, al someter las células a un estrés y posteriormente agregar las nanopartículas con glutatión posiblemente se está favoreciendo que el proceso sea reversible y por lo tanto, se activen nuevamente estas enzimas llevando a cabo el proceso de ubiquitinación con la degradación de las proteínas blanco por el proteosoma, lo cual explicaría el hecho de que las nanopartículas solas no disminuyeran en gran medida la función similar a quimotripsina del proteosoma. Sin embargo para comprobar esto, es necesario evaluar específicamente la función de estas enzimas y sus repercusiones en el proceso de ubiquitinación.

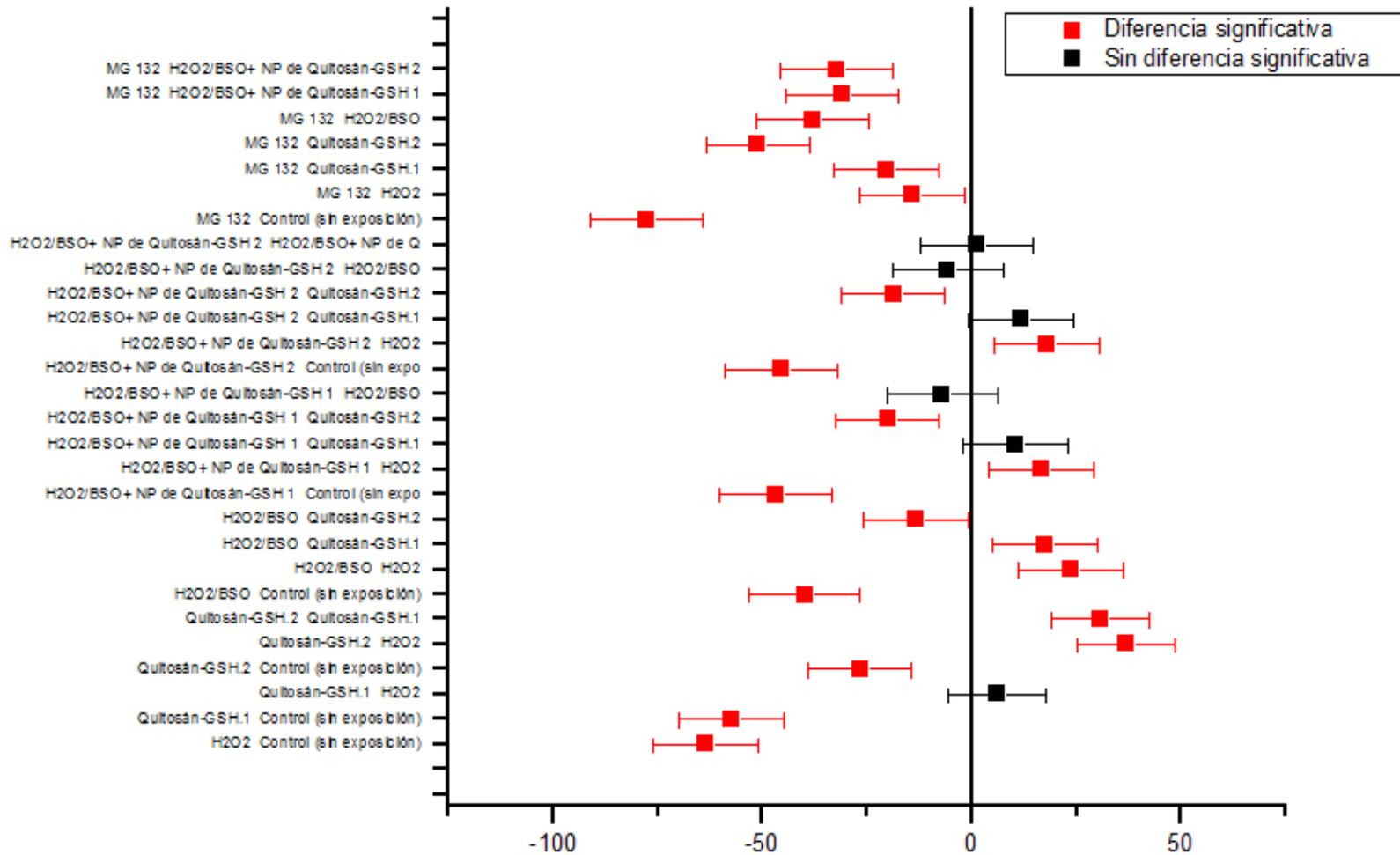
Otra forma en que las nanopartículas de Quitosán-GSH posiblemente modularon el estado oxido-redox producido, es mediante la modificación de los grupos sulfhidrilos de las proteínas, con la formación de disulfuros mixtos y su posterior reducción. Cuando GSH se conjuga con compontes electrofilicos mediante la glutatión transferesa (GST), la excreción de estos conjugados favorecen la reducción de toxinas en la célula. Esta solo es una hipótesis de lo que posiblemente ocurrió sin embargo es necesario realizar más pruebas para comprobarla (Martin & Teismann, 2009).

En el caso de las enzimas deubiquinizantes (Grafica 7 y 8) la actividad se vio reducida en todos los sistemas, lo cual se puede asociar a las ROS y radicales libres como se mencionó en el caso de las nanopartículas de PECA y SiO₂. En este caso, la disminución de la actividad fue más evidente debido al estrés al que se sometieron las células fue mayor, y por lo tanto, hubo mayor inhibición de las enzimas, ya que a pesar de ser un mecanismo reversible, el tiempo de restauración se desconoce. El grado de inhibición producida por ROS puede ser altamente específico para DUBs individuales y puede depender de la reactividad del sitio basal thiol o de la forma geométrica del sitio activo. La inactivación mediada por ROS es un mecanismo asociado a el ajuste del estrés de rutas de señalización activadas (Cotto-Rios 2013).



Grafica 7 Comparación del porcentaje de actividad de enzimas deubiquitinizantes en células expuestas a sistemas nanoparticulados preparados a base de Quitosán-GSH, células expuestas a H₂O₂, el inhibidor del proteosoma MG132 y el control (células no expuestas). Las barras con (*) indican que hay diferencias significativas entre las medias correspondientes $p < 0.05\%$.

Prueba Tukey para los sistemas nanoparticulados de Quitosán-GSH



Gráfica 8 Análisis estadístico de comparación mediante la prueba de Tukey de la actividad de enzimas deubiquitinizantes en el que se muestran las diferencias estadísticas significativas entre las medias correspondientes $p < 0.05\%$ de los sistemas nanoparticulados preparados a base de Quitosán-GSH, el inhibidor del proteosoma MG 132, células expuestas a H₂O₂ y el control (células no expuestas).

7. CONCLUSIONES

Se evaluó el efecto sobre la actividad similar a quimotripsina del proteosoma en células hepáticas de ratón expuestas a diversos sistemas nanoparticulados. En el caso de las nanopartículas de PECA y SiO₂ se encontró una mayor toxicidad en los sistemas de PECA y el sistema híbrido 2,1 PECA/SiO₂, mientras que en la determinación de la actividad de enzimas deubiquitinizantes el único sistema que mostro afectar de manera significativa la actividad de estas enzimas fue el sistema de PECA.

En el caso de las nanopartículas de Quitosán-GSH se encontró que la actividad similar a quimotripsina del proteosoma, se ve afectada en mayor proporción por las nanopartículas de Quitosán-GSH 1 en comparación al control (células sin exposición a las NP) y células expuestas a H₂O₂. En cuanto a la actividad de enzimas deubiquitinizantes todos los sistemas tienen diferencias significativas con el control, es decir disminuyen de manera significativa el porcentaje de actividad de estas enzimas. Sin embargo el sistema Quitosán-GSH.1, es el único sistema que no muestra diferencias significativas con las células expuestas a H₂O₂, por lo tanto afecta la actividad de estas enzimas de la misma manera que lo hace la exposición con H₂O₂.

Se logró identificar que las nanopartículas de Quitosán-GSH al ser agregadas después de someter a las células a un estrés oxidativo inducen efectos moduladores del estado oxido-reducción y por lo tanto se cree que se asocia a la presencia de GSH en las nanopartículas. Sin embargo esta modulación también puede ser debido a la activación de las enzimas E1 y E2 que están involucradas en el proceso de ubiquinización por lo que es necesario realizar más estudios para comprobar cuál es mecanismos que siguen esta nanopartículas.

8. PERSPECTIVAS

En este trabajo se evaluó el efecto de las nanopartículas de SiO₂, PECA y Quitosán-GSH en la actividad similar a quimotripsina del proteosoma, sin embargo, para tener una mayor visión de los efectos que se puedan llegar a producir es necesario evaluar las otras dos actividades de este sistema. Debido a que es un sistema biológico, la modificación en una función tiene efectos sobre otros mecanismos de regulación presentes en la célula.

Para los siguientes trabajos también podría ser de utilidad evaluar el proceso de ubiquitinación ya que al formar parte esencial para la degradación de proteínas por la vía del proteosoma es importante ver si hay alguna modificación en la función de alguna de las enzimas E1, E2, o E3 o si se ve favorecida o inhibida la interacción con la proteína blanco al ser expuestas las células a las nanopartículas.

A pesar de haberse descubierto hace muchos años el Sistema Ubiquitina-Proteosoma, todavía hay muchas interrogantes en cuanto a sus funciones y a sus mecanismos de activación o inhibición, por lo tanto analizar los efectos debido a la utilización de nanopartículas puede ser de gran utilidad para la producción de fármacos menos tóxicos como es el caso de enfermedades cancerígenas donde se requiere la inhibición de proteínas específicas y que a la larga modifiquen o afecten lo menos posible las actividades biológicas normales de los individuos.

En cuanto a las nanopartículas de PECA y SiO₂ los estudios realizados tanto en trabajos anteriores como en este trabajo, solo son una parte de todos los estudios que se tienen que realizar. Puesto que ya se ha determinado que hay cierta toxicidad asociada a su uso de manera *in vitro* e *in vivo*, es necesario realizar pruebas en otros modelos experimentales, para comprobar o asociar los resultados obtenidos y ver si se afecta de la misma manera a nivel celular.

En el caso de las nanopartículas de Quitosán-GSH una vez establecida la hipótesis de que posiblemente haya una modulación del equilibrio oxido-redox al agregar las NP, se requiere realizar más pruebas para encontrar cuál es el mecanismo por el cual el glutatión presente en estas NP actúa en respuesta a la presencia de ROS y radicales libre la célula y modula el estrés oxidativo, además de evaluar si pudiera a ver alguna otra función del glutatión que pudiera verse favorecida con su incremento, como es el transporte y almacenamiento de cisteína o su función como cofactor para reacciones de isomerización.

Por otro lado el efecto que tuvieron en las enzimas deubiquitinizantes también representa gran interés por lo que se sugiere el estudio de estos efectos asociados a la exposición de las nanopartículas de interés con sustratos que puedan ser degradados por estas enzimas para saber si se obtiene el mismo resultado.

Todavía faltan muchos experimentos que realizar para determinar si las nanopartículas estudiadas pueden utilizarse como acarreadores de fármacos, sin embargo los avances realizados permiten conocer efectos celulares asociados a su capacidad tóxica y por lo tanto permitirá realizar las modificaciones necesarias ya sea en el modo de preparación, la dosis utilizada, el tiempo de exposición, la concentración entre otros factores que en conjunto contribuirán en un futuro a conocer su mecanismo de acción.

9. REFERENCIAS

- Aiken, C. T. Kaake, R. M., Wang, X., & Huang, L. (2011). Oxidative Stress-Mediated Regulation of Proteasome Complexes. *Molecular & Cell Proteomics*, 10(5), 1-11. doi: 10.1074/mcp.R110.006924 -1
- Amerik, A. Y., & Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1695, 189-207. doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.10.003
- Angoa, P.M. & Selva, R.A. (2007). Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia?. *Arch Neurociencia*, 12(1), 45-54. Recopilado de http://www.artemisaenlinea.org.mx/acervo/pdf/archivos_neurociencias/6%20Estres%20oxidativo.pdf
- Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2007). *Biología*. Madrid, España: Medica Panamericana.
- Canudas, V. C. M. (2013). Evaluación de la citotoxicidad inducida por sistemas nanoparticulados de SiO₂ /PECA en sistemas *in vivo*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Edo. de México, México.
- Castro, B. V. (2008). Estudio de los efectos del arsénico sobre la actividad proteosomal en cultivos organolépticos de hígado de ratón. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México.
- Ciechanover, A. (2005). Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the Ubiquitin-Proteasome System and onto human diseases and drug targeting. *Cell Death and Differentiation*, 12, 1178-1190. doi: 10.1038/sj.cdd.4401692
- Ciechanover, A. (2009). Tracing the history of the ubiquitin proteolytic system: the pioneering article. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378 (1), 1-10. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.06.065
- Ciechanover, A. (2010a). The Ubiquitin System: Historical Perspective. *American Thoracic Society*, 7(1), 11-12. doi: 10.1513/pats.200908-095JS
- Ciechanover, A. (2010b). Intracelular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the Ubiquitin-Proteasome System and onto human diseases and drug targeting. *Medicina*, 70 (2), 105-119. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20447892>
- Cotto-Rios, X. M., Békés, M., Chapman, J., Ueberheide, B. & Huang, T. T. (2013). Deubiquitinases as a signaling target of oxidative stress. *Cell Rep.*, 2(6), 1475-1484. doi: 10.1016/j.celrep.2012.11.011.Deubiquitinases
- Curtis, H. (2006). *Invitación a la Biología*. Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.
- Da Fonseca, P.C.A. He, J. & Morris, E.P. (2012). Molecular Model of the Human 26S Proteasome. *Molecular Cell*, 46, 54-66. doi: 10.1016/j.molcel.2012.03.026
- Dang, L.C. Melandri, F. D & Stein R.L. (1998). Kinetic and Mechanistic Studies on the Hydrolysis of Ubiquitin C-Terminal 7-Amido-4-Methylcoumarin by Deubiquitinating Enzymes. *Biochemistry*, 37 (7), 1868-1879. doi: 10.1021/bi9723360

- De la Cruz, M. M. (2010). Preparación, caracterización y uso de nanopartículas farmacéuticas (Investigación Bibliográfica). (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Edo. de México, México.
- Díaz, P.J. D. (2013). Evaluación de la citotoxicidad inducida por nanopartículas de dióxido de silicio (SiO₂) y PECA *in vitro*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Edo. de México, México.
- Díaz, T. R. (2007). Producción y estudio de nanopartículas de etilcianoacrilato: su transporte a través de la piel. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México
- Falaschetti, C.A., Paunesku, T., Kurepa, J., Nanavati, D., Chou, S. S., Song M., ...& Woloschak, G.E. (2013). Negatively Charged Metal Oxide Nanoparticles Interact with the 20S Proteasome and Differentially Modulate Its Biologic Functional Effects. *ACS Nano*, 7 (9), 7759-7772. doi: 10.1021/nm402416h
- Fede, C., Selvestrel, F., Compagnin, C., Mognato, M., Mancin, F., Reddi, E., & Celotti, L.(2012). The toxicity outcome of silica nanoparticles (Ludox ®) is influenced by testing techniques and treatment modalities. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404, 1789-802. doi: 10.1007/s00216-012-6246-6
- Gasca, Z. B. (2011). Evaluación de la capacidad citotóxica de sistemas nanoparticulados a base de quitosán y polietilenoacrilato (PECA). (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Edo. de México, México.
- González, G. J. (2012). Cianoacrilato: Definición y propiedades. Toxicidad y efectos secundarios. Aplicaciones en medicina y odontología. *Avances en odontoestomatología*, 28 (2), 95-102. Recuperado de <http://www.yumpu.com/es/document/view/13839862/cianoacrilato-definicion-y-propiedades-toxicidad-y-efectos->
- Grune, T. (2012). *The proteasomal system in aging and disease*. U.S.A: EL SEVIER.
- Han, Y. H., Moon, H. J. You, B. R., & Park, W. H. (2009). The effect of MG132, a proteasome inhibitor on Hela cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncology Reports*, 22, 215-221. doi: 10.3892/or_00000427
- Hans, M. L., & Lowman, A. M. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6, 319-327.
- Jahngen-Hodge, J., Obin, M. S., Gong, X., Shang, F. Nowell, T. R., Gong, J...& Taylor, A. (1997). Regulation of Ubiquitin-conjugating Enzymes by Glutathione Following Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (45), 28218-28226. doi: 10.1074/jbc.272.45.28218
- Janes, K. A., Fresneau, M. P., Marazuela, A., Fabra, A., & Alonso, M. J. (2001). Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *Journal of Controlled Release*, 73, 255-267.
- Jung, T., & Grune, T. (2008). The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins. *IUBMB life*, 60(11), 743-52. doi:10.1002/iub.114

- Kisselev, A.F., Van der Linden, W.A. & Overkleeft H. S. (2013). Proteasome Inhibitors: An Expanding Army Attacking a Unique Target. *Chem Biol.*, 19 (1), 99-115. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.01.003.Proteasome
- Kloetzel, P.-M. (2001) Antigen Processing by the Proteasome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(3), 179-187. doi: 10.1038/35056572
- Komander, D. Clague, M. J. & Urbe S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Molecular Cell Biology*, 10, 550-563. doi: 10.1038/nrm2731
- Koolman, J., & Klaus-Heirrich, R. (2005). *Bioquímica: Texto y Atlas*. Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.
- Kreuter, J. (2007). Nanoparticles- a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 331, 1-10. doi 10.1016/j.ijpharm.2006.10.021
- Lee, C.M., Kumar, V., Riley, R. I. & Morgan, E. T. (2010). Metabolism and Action of Proteasome Inhibitors in Primary. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 38 (12), 2166-2172. doi: 10.1124/dmd.110.035501.
- Li X, Min M, Du N, Gu Y, Hode T, Naylor M, Chen D, Nordquist RE, & Chen WR. Chitin, Chitosan, and Glycated chitosan Regulate Immune Responses: The novel Adjuvants for Cancer Vaccine. *Clin. Developmental Immunology*. 2013. doi: 10.1155/2013/387023
- Llabot, J. M., Palma, S. D., & Allemandi, D. A. (2008). Nanopartículas Poliméricas Sólidas. *Farmacotecnia*, 53, 40-47. Recuperado de <http://www.facaf.org.ar/main/revista/numeros/n53/farmacotecnia.pdf>
- Mahapatro, A., & Singh, D. K. (2011). Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), 55. doi: 10.1186/1477-3155-9-55
- Martin, H. L., & Teismann, P. (2009). Glutathione-a review on its role and significances in Parkinson's disease. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 23 (10), 3263-3272. doi: 10.1096/fj.08-125443
- Mu, Q., Hondow, N. S., Krzemiński, L., Brown, A. P., Jeuken, L. J. C., & Routledge, M. N. (2012). Mechanism of cellular uptake of genotoxic silica nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 9, 1-11. doi: 10.1186/1743-8977-9-29
- Neutzner, A., Li, S., Xu, S., & Karbowski, M. (2012). The Ubiquitin/Proteasome system-dependent control of mitochondrial steps in apoptosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(5), 499-508. doi: [10.1016/j.semcd.2012.03.019](https://doi.org/10.1016/j.semcd.2012.03.019)
- Nobel. (2013). Nobel Media 2013. Recuperado el 12 de Septiembre del 2013, de <http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/tem/>
- Passarge, E. (2009). *Genética Texto y Atlas*. Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.
- Pickering, A. M. & Davies, K. J. A. (2013). Differential Roles of Proteasome and Immunoproteasome Regulators Pa28aB, Pa28y and Pa200 in the Degradation of Oxidized Proteins. *Arch Biochem Biophys*, 523(2), 181-190. doi:10.1016/j.abb.2012.04.018.Differential

- Piña, O. S. (2013). Evaluación del efecto genotóxico inducido por nanopartículas fabricadas a base de PECA Y SiO₂ mediante el ensayo cometa (Electroforesis Unicelular). (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Edo. de México, México.
- Pinto, R. C., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J. & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(1), 8-21. doi: 10.1016/j.nano.2005.12.003
- Poljsak, B. (2011). Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-15. doi: 10.1155/2011/194586
- Poljsak, B., & Milisav, I. (2012). The Neglected Significance of Antioxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-12. doi: 10.1155/2012/480895
- Rabinovich, G. A. (2004). *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina: un nexo entre la investigación Biomédica y la práctica clínica*. Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.
- Ramos-Cabrera, P., & Campos, F. (2013). Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets. *International journal of nanomedicine*, 8, 951–60. doi:10.2147/IJN.S30721
- Repetto, J.M. & Repetto, K.G. (2009). *Toxicología fundamental*. Madrid, España: Diaz de Santos.
- Reyes-Turcú, F.E. & Wilkinson, K.D. (2010). Polyubiquitin binding and disassembly by deubiquitinating enzymes. *Chem Rev.*, 109 (4), 1495-1508. doi: 10.1021/cr800470j.Polyubiquitin
- Schaffazick, S.R. & Guterres, S. S. (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química nova*, 26(5), 726-737. doi: org/10.1590/S0100-40422003000500017
- Sekine, S., Mitsuki, K., Ito, K., Kugioka, S., & Horie, T. (2012). Sustained intrahepatic glutathione depletion causes proteasomal degradation of multidrug resistance-associated protein 2 in rat liver. *Biochimica et biophysica Acta*, 1822(6), 980–7. doi:10.1016/j.bbadis.2012.01.015
- Serena, P. A. (2013). Acercando la Nanotecnología a la Sociedad: La Exposición Un paseo por el nanomundo. *Rev. Digital Universitaria*, 14 (4), 1-16. Recuperado de <http://www.revista.unam.mx/vol.14/num4/art29/index.html>
- Tanaka, K. (1998). Molecular Biology of the Proteasome. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 247(3), 573-541. doi: 10.1006/bbrc.1998.8617
- Tanaka, K. (2009). Review The Proteasome: Overview of structure and functions. *The Japan Academy*, 85, 12-36. doi: 10.2183/pjab/85.12
- Tomey, A. V. & Ortega, Y. V. (2000) Relaciones del estrés oxidativo con el catabolismo de proteínas. *Rev Cubana Investigaciones Biomédicas*, 19(3), 206-212. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002000000300012&script=sci_arttext
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.

- Tu, Y., Chen, C., Pan, J., Xu, J. Zhou, Z.-G., & Wang, C.-Y. (2012). The Ubiquitin Proteasome Pathway (UPP) in the regulation of cell cycle control and DNA damage repair and its implication in tumorigenesis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 5 (8), 726-738. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3466981/>
- UniProt. (2002-2013a). Recuperado el 11 de Junio de 2013, de <http://www.uniprot.org/uniprot/P0CG48>
- Vasudevan, DM, Sreekumari, S. & Vaidyanathan K. (2001). *Texto de Bioquímica*. Jalisco, México: Cuéllar Ayala
- Velasco-Rodriguez, V., Cornejo-Mazón, M. Flores-Flores, J. O Gutiérrez-López, G. F. & Hernández-Sánchez, H. (2012). Preparación y propiedades de nanopartículas de quitosano conteniendo ácido alfa lipoico. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11 (1), 155-161. Recuperado de http://rmiq.org/new%20page/Vol_11_No_1_Nano1.html
- Wang, J. J., Zeng, Z. W., Xiao, R. Z., Xie, T., Zhou, G. L., Zhan, X. R., & Wang, S.L. (2011). Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 765-774. doi: 10.2147/IJN.S17296
- Werner, M. E. (2006). *Bioquímica: Fundamentos para Medicina y Ciencias de la vida*. Barcelona, España: Reverté.
- Wu, H., Lo, Y.-C., & Lin, S.-C. (2010). Recent advances in polyubiquitin chain recognition. *Biology Reports*, 2 (20), 1-5. doi: 10.3410/B2-20
- Yang, W. Zhang, X. & Lin, H. (2010). Emerging role of Lys-63 ubiquitination in protein kinase and phosphatase activation and cancer development. *Oncogene*, 29 (32), 4493-4503. doi: 10.1038/onc.2010.190.Emerging
- Yordanov, G., & Bedzhova, Z. (2011). Poly(ethyl cyanoacrylate) Colloidal particles tagged with Rhodamine 6G: preparation and physicochemical characterization. *Central European Journal of Chemistry*, 9(6), 1062-1070. doi: 10.2478/s11532-011-0090-y
- Zeta-Meter. (27 de Septiembre del 2011). DePA. Recuperado el 13 de Septiembre del 2013 http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/PotencialZeta_1246.pdf