



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EFFECTOS DEL DIÓXIDO DE TITANIO GRADO
ALIMENTICIO EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE
CEREBRO EN UN MODELO MURINO**

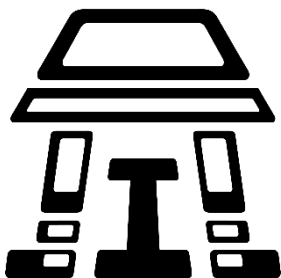
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Jocelyn Lucero Lomeli Castillo



Directora de tesis:

Dra. Verónica Freyre Fonseca

2018

Los Reyes Iztacala, Tlanepantla, Estado de México



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.

*Haz lo que dices que vas a hacer.
Y trata de hacerlo un poco mejor de lo que dijiste que lo harías.*

Jimmy Dean

*Sabemos demasiado y estamos convencidos de muy poco.
Nuestra literatura es un sustituto para la religión,
y también lo es nuestra religión.*

T. S. Eliot

DEDICATORIA

Primero que nada, quiero dedicar este proyecto a mi madre Magda porque gracias a ella he terminado mi camino, jamás me dejaste sola y a pesar de que no fue fácil, siempre estuviste para mí en cada momento; cuando me tropecé tú me ayudaste a levantarme; cuando me rendí me dijiste que siguiera porque así era la vida y que había que continuar enfrentándola con la cara en alto; cuando me equivoque me escuchaste sin juzgarme; cuando me hicieron daño me consolaste y me ayudaste a ser más fuerte; y demostrar que yo soy una mujer valiente y que nadie puede hacerme daño; cuando llore llorabas conmigo y te dolía más que a mí, cuando reía tu reías conmigo, cuando tenía un logro ambas festejábamos como locas, porque no sólo fue mi logro, si no de las dos, y a las dos nos costó mucho trabajo llegar a la meta. Por esto y más, quiero darte las gracias mamá, porque gracias a ti, soy lo que soy y tengo lo que siempre quise, y sobre todo que no estaría aquí si no fuera por ti. Porque sé que tú también sufriste y que hiciste todo lo posible porque yo no pasara por lo mismo, ésto es para tí. ¡Gracias!

Dedico este trabajo a toda mi familia, mi papá y mis hermanos porque fueron un importante pilar en el transcurso de mi vida, por lo que fue y por lo que vendrá junto a ustedes. Siempre tuve ese hogar lleno de amor, el lugar donde compartí descansos, estudios, sueños y experiencias inolvidables, porque estoy orgullosa de pertenecer a mi familia, saber que soy parte de algo y que soy amada y aceptada por todos ustedes.

A mi querido Kevin Jair Aguilar, que en estos últimos años se convirtió en una de las personas más importantes en mi vida y me ayudó en muchos aspectos, luchando junto a mí como nadie lo ha hecho, eres la única persona que realmente me conoce, y aun así siempre has estado ahí para mí, escuchándome y consolándome. Me alegro que en esta última etapa estuvieras siempre para mí y darlo todo conmigo. Porque hemos pasado muchas cosas juntos y espero que jamás termine. Con todo mi cariño te dedico esta tesis, porque no sé qué hubiera hecho sin ti. Además te agradezco infinitamente por haberme ayudado con los dibujos presentados en esta tesis.

Por último pero sin ser menos importante a mí querida UNAM, porque me dio la gran oportunidad de cumplir mi sueño y ser una profesionista, me enseñó mucho entre ello disciplina, sencillez, humildad y amar la Biología. Porque sin disciplina, orden y armonía es difícil seguir un sistema para obtener un resultado.

*Los pensamientos te llevan a tus propósitos,
tus propósitos a tus acciones,
tus acciones a tus hábitos,
tus hábitos a tu carácter
y tu carácter determina tu destino.*

Tyron Edwards

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer el apoyo brindado por parte de la BECA PARA TITULACIÓN EGRESADOS ALTO RENDIMIENTO 17-18, así como a los proyectos PAPIIT IN215915 (EBGCM) y PAPIIT IN218015, para la realización de este trabajo.

Agradezco el amable apoyo ofrecido por parte del laboratorio 10 de la UBIMED, tanto a los compañeros como a las doctoras, porque siempre fue divertido convivir con cada uno de ustedes. En especial, a la Dra. Yolanda Irasema Chirino López por brindarme un lugar de trabajo en su laboratorio y así brindarme la oportunidad de poder concluir con esta meta.

A mis sinodales; Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos Madrid, Dra. Ana María García Bores, Dra. Verónica Freyre Fonseca, Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro y al Dr. Citlaltépetl Salinas Lara por sus valiosas aportaciones y comentarios, para mejorar este trabajo.

A la Dra. Emma Bertha Gutiérrez Cirlos Madrid por haberme brindado el apoyo infinito con todos sus medios posibles para concluir este gran sueño, por las enseñanzas, por las orientaciones y por todo, muchas gracias. Así como a la M. en C. Tecilli Cabellos Avelar por ayudarme y apoyarme enormemente con este trabajo y en muchos aspectos más, porque encontré en ella una gran amiga, muchas gracias, porque me enseñaste muchas cosas y una de ellas no dejarme vencer.

A la Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro por su aprecio y cariño, por sus bromas y risas compartidas, gracias por preocuparse por mí y escucharme. A todos los compañeros del laboratorio por sus anécdotas contadas y aventuras compartidas.

A mi tutora Verónica Freyre por confiar en mí, en que podía cumplir mi meta sin importar todo lo que pasara, por enseñarme todo lo que aprendí en este último gran paso y enseñarme como debo ser en el futuro y que es lo que debo buscar.

A la Dra. María Rosa Ávila por brindarme la oportunidad de aprender en su laboratorio, cosas que en otro lugar jamás hubiera podido aprender. Muchas gracias por su espacio compartido conmigo. En especial, al Técnico académico José de Jesús Espinosa Villanueva por enseñarme muchas cosas, le agradezco su tiempo dedicado para mí, por siempre escucharme, enseñarme y apoyarme en todo lo que se pudo, en verdad, muchas gracias.

Además quiero agradecer el gran apoyo ofrecido en las microcopias presentadas en este trabajo por parte del Dr. Edgar Oliver López Villegas, Central de Instrumentación y Microscopias (ENCB – IPN).

A la Ing. en Farmacobiología Melisa Hidekel Durán Palma, por convertirse en una gran persona en esta última etapa de mi meta, porque me conoces muy bien y me has apoyado en todo, tus alientos y motivaciones siempre fueron un gran impulso, por esto y más, muchas gracias.

A Paola Rodríguez por su amable donación de la Figura 17B, convivimos poco tiempo juntas pero fue lo suficiente para darme cuenta que eres una gran persona, gracias por escucharme siempre que te lo pedía y apoyarme en todo lo que me pasaba.

A mis amigos Mayra, Maryjose, Jonathan, Edher, Adrián, Itzayana porque gracias a todos ustedes la carrera fue más amena y divertida, pasamos increíbles momentos de risa, tristeza y una que otra travesura. Por qué más que amigos se convirtieron en una gran familia para mí, siempre me apoyaron cada uno a su manera, y yo los quería sin importar nada. Gracias por jamás haberse ido y espero que continuemos siendo todos nosotros para siempre sin importar el rumbo que tomemos en el futuro.

*Queda prohibido llorar sin aprender,
levantarte un día sin saber que hacer,
tener miedo a tus recuerdos.
Queda prohibido no sonreír a los problemas,
no luchar por lo que quieres,
abandonarlo todo por miedo,
no convertir en realidad tus sueños.
Queda prohibido dejar a tus amigos,
no intentar comprender lo que vivieron juntos,
llamarles solo cuando los necesitas.
Queda prohibido no hacer las cosas por tí mismo,
tener miedo a la vida y a sus compromisos,
no vivir cada día como si fuera un último suspiro.*

Alfredo Cuervo Barrero

CONTENIDO

CONTENIDO

| | Página |
|---|---------------|
| Resumen | 1 |
| 1. Introducción | |
| 1.1. Nanotecnología y nanopartículas. | 5 |
| 1.2. Dióxido de titanio. | 6 |
| 1.2.1. Dióxido de titanio como aditivo alimentario (E171). | 7 |
| 1.3. Efectos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> por la exposición a NPs de TiO ₂ . | 9 |
| 1.4. Barrera hematoencefálica. | 10 |
| 1.4.1. Cruce de NPs a través de la BHE. | 12 |
| 1.5. Funcionamiento mitocondrial. | 13 |
| 1.6. La mitocondria en el cerebro. | 15 |
| 2. Justificación | 19 |
| 3. Hipótesis | 19 |
| 4. Objetivos | |
| 4.1. Objetivo general. | 19 |
| 4.2. Objetivos específicos. | 19 |
| 5. Materiales y Método | |
| 5.1. Materiales. | |
| 5.1.1. Programas | 23 |
| 5.1.2. Reactivos | 23 |
| 5.1.3. Animales. | 24 |
| 5.2. Método. | |
| 5.2.1. Caracterización de partículas E171 en solución salina y suero de rata. | 24 |

| | |
|--|----|
| 5.2.2. Evaluación de la actividad respiratoria de las mitocondrias aisladas de cerebro de rata expuestas a E171. | |
| 5.2.2.1. Preparación de partículas de E171 para oximetrías. | 24 |
| 5.2.2.2. Manipulación de animales | 25 |
| 5.2.2.3. Obtención de cerebro de rata | 25 |
| 5.2.2.4. Extracción de mitocondrias de cerebro de rata. | 25 |
| 5.2.2.5. Exposición de mitocondrias de cerebro de rata a partículas E171. | 26 |
| 5.2.2.6. Determinación de la función respiratoria. | 27 |
| 5.2.3. Cambios morfológicos de mitocondrias ocasionados por las E171. | |
| 5.2.3.1. Extracción de mitocondrias para estudios de morfología. | 28 |
| 5.2.3.2. Adquisición de imágenes de mitocondrias por microscopia electrónica de transmisión. | 29 |
| 5.2.3.3. Análisis Digital de Imagen (ADI). | 29 |
| 5.2.4. Obtención de zonas cerebrales en las que las E171 son acumuladas cuando se inyectan vía intravenosa. | |
| 5.2.4.1. Inyección intravenosa a ratas Wistar. | 30 |
| 5.2.4.2. Mantenimiento de animales | 31 |
| 5.2.4.3. Sacrificio de animales. | 32 |
| 5.2.4.4. Disección de cerebro de rata y zonas cerebrales. | 32 |
| 5.2.4.5. Procesamiento de zonas cerebrales para TEM | 33 |
| 5.2.5. Análisis estadísticos. | 35 |
| 6. Resultados | |
| 6.1. Caracterización de las partículas E171. | 38 |
| 6.2. Evaluación de la actividad respiratoria de las mitocondrias aisladas de cerebro de rata expuestas a E171. | 38 |

| | |
|---|----|
| 6.3. Cambios morfológicos de mitocondrias ocasionados por las E171. | 44 |
| 6.3.1. Análisis digital de Imágenes: Morfometría mitocondrial, después del tratamiento con E171. | 45 |
| 6.4. Ubicación cerebral de las E171 acumuladas. | 47 |
| 7. Discusión | |
| 7.1. Caracterización de partículas. | 51 |
| 7.2. Actividad respiratoria de las mitocondrias. | 52 |
| 7.3. Cambios morfológicos de las mitocondrias. | 55 |
| 7.4. Ubicación de partículas E171 en cerebro de rata. | 56 |
| 7.5. Planteamiento del modelo de los efectos del E171 en mitocondrias aisladas de cerebro de rata | 58 |
| 8. Conclusiones | 62 |
| 9. Referencias | 65 |
| Glosario | 80 |
| Anexos | 84 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| Figura 1. Barrera hematoencefálica (BHE). | 11 |
| Figura 2. Algunas vías por las que una sustancia puede cruzar la BHE y llegar al parénquima cerebral. | 13 |
| Figura 3. Fosforilación oxidativa en la membrana interna de la mitocondria. | 15 |
| Figura 4. Grafico representativo del consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de cerebro de rata. | 28 |
| Figura 5. Imagen representativa del procesamiento para obtener el ADI de mitocondrias de cerebro de rata. | 30 |
| Figura 6. Cámara de acrílico para inmovilizar a las ratas durante la inyección intravenosa de E171 por la vena caudal. | 31 |
| Figura 7. Imagen representativa del procedimiento para obtener imágenes por TEM de zonas específicas de cerebro de rata. | 33 |
| Figura 8. Imagen representativa del procedimiento para obtener el hemisferio derecho de cerebro de rata. | 34 |
| Figura 9. Imagen de apoyo para localizar las zonas cerebrales de rata en un corte sagital. | 34 |
| Figura 10. Estrategia metodológica en resumen de las actividades realizadas. | 35 |
| Figura 11. Microscopía electrónica de transmisión de un aglomerado de E171 suspendido en solución salina y 15% suero de rata sonicado 30 min a 40 Hz (75,000 X). | 38 |
| Figura 12. Datos del consumo de O ₂ de mitocondrias aisladas de cerebro de rata, incubadas con 1mg de E171/mg proteína a diferentes tiempos de exposición (45, 60 y 90 min), en la primera adición de ADP (0.14 mM). | 41 |
| Figura 13. Consumo de O ₂ de mitocondrias aisladas de cerebro de rata, incubadas con 1mg de E171/mg proteína a diferentes tiempos de exposición (45, 60 y 90 min), con la segunda adición de ADP (0.36 mM). | 43 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 14. Imágenes TEM de mitocondrias de cerebro de rata incubadas durante 45, 60 y 90 min, con 1mg de E171/mg de proteína mitocondrial, con sus respectivos controles. 40000 X. | 45 |
| Figura 15. Cambios morfológicos y morfométricos de las mitocondrias aisladas de cerebro de rata, incubadas con E171 a diferentes tiempos. | 46 |
| Figura 16. Cortes de cerebro de rata de hipocampo, tálamo y corteza; de ratas control y ratas tratadas 24h antes con 1mg/kg de E171 por vía intravenosa. | 47 |
| Figura 17. Imágenes de microscopías de E171. | 48 |
| Figura 18. Posible representación en el tiempo de lo que le ocurre a las mitocondrias de cerebro de rata cuando son expuestas a partículas de E171 (1mg/ml) e incubadas durante 45, 60 y 90 min. | 59 |
| | |
| Figura A1. Modo de inyección por vía intravenosa en la vena caudal de la rata. | 90 |
| Figura A2. Primer paso en el procesamiento del ADI. | 91 |
| Figura A3. Forma de calibrar en el programa Image J. | 91 |
| Figura A4. Forma de marcar las unidades en el programa ImageJ. | 92 |
| Figura A5. Selección de la Imagen que se va a trabajar. | 92 |
| Figura A6. La imagen con la que se va a trabajar se duplica. | 93 |
| Figura A7. Modo de obtener el ajuste de umbral. | 93 |
| Figura A8. Obtención de la imagen binarizada. | 94 |
| Figura A9. Forma de limpiar la imagen binarizada. | 94 |
| Figura A10. Selección de los parámetros deseados. | 95 |
| Figura A11. Selección de casillas por analizar por cada partícula de la imagen binarizada. | 95 |
| Figura A12. Obtención de la imagen analizada. | 96 |

| | |
|---|-----------|
| Figura A13. Trazos originales del consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas del hemisferio derecho de cerebro de rata control (izquierda) y expuestas a partículas de E171 (derecha) incubadas durante 45 min. | 97 |
| Figura A14. Trazos originales del consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas del hemisferio derecho de cerebro de rata control (izquierda) y expuestas a partículas de E171 (derecha) incubadas durante 60 min. | 98 |
| Figura A15. Trazos originales del consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas del hemisferio derecho de cerebro de rata control (izquierda) y expuestas a partículas de E171 (derecha) incubadas durante 90 min. | 99 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|---|---------------|
| Tabla 1. Clasificación general de los aditivos alimentarios (números E) por la Unión Europea. | 7 |
| Tabla 2. Parámetros iniciales de la función respiratoria de mitocondrias aisladas del hemisferio derecho de cerebro de rata sin tratamiento. | 39 |
| Tabla 3. Valores control de las dos adiciones de ADP (ADP1= 0.14 mM y ADP2= 0.36 mM) de mitocondrias aisladas del hemisferio derecho de cerebro de rata de todos los parámetros de la función respiratoria en cada tiempo. | 42 |
| Tabla 4. Valores de las dos adiciones de ADP (ADP1= 0.14 mM y ADP2= 0.36 mM) de mitocondrias aisladas del hemisferio derecho de cerebro de rata tratadas con E171 en todos los parámetros de la función respiratoria en cada tiempo de exposición (45, 60 y 90 min). | 44 |

| | |
|---|------------|
| Tabla A1. Parámetros de la función respiratoria de mitocondrias control en todos los intervalos de tiempo, los cuales representan los valores de la primera adición de ADP (0.14 mM). | 100 |
| Tabla A2. Parámetros de la función respiratoria de mitocondrias control en todos los intervalos de tiempo, los cuales representan los valores de la segunda adición de ADP (0.36 mM). | 100 |
| Tabla A3. Parámetros de la función respiratoria de mitocondrias tratadas con E171 en todos los tiempos de exposición (45, 60 y 90 min), los cuales representan los valores de la primera adición de ADP (0.14 mM). | 101 |
| Tabla A4. Parámetros de la función respiratoria de mitocondrias tratadas con E171 en todos los tiempos de exposición (45, 60 y 90 min), los cuales representan los valores de la segunda adición de ADP (0.36 mM). | 101 |

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADI Análisis Digital de Imagen

ADP Adenosín difosfato

ATP Adenosín trifosfato

BSA Albúmina Sérica Bovina: Del inglés, Bovin Suerum Albumin

BHE Barrera Hematoencefálica

CR. Control Respiratorio

DLS Dispersión de luz dinámica

E171 Dióxido de titanio grado alimenticio

EFSA Agencia Europea de Seguridad en Alimentos: Del inglés, European Food Safety Authority

ERO Especies reactivas de oxígeno

FDA Agencia de Medicamentos y Alimentos: Del inglés, Food and Drug Administration

IARC: Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer: Del inglés, International Agency for Research on Cancer

NIOSH Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional: Del inglés, The National Institute for Occupational Safety an Health

NM Nanomaterial

NPs Nanopartículas

SN Sobrenadante

SNC Sistema Nervioso Central

TEM Microscopia Electrónica de Transmisión

TiO₂ Dióxido de titanio

RESUMEN

RESUMEN

Las nanopartículas de dióxido de titanio (NPs de TiO_2) esféricas se utilizan en diversas áreas como la farmacéutica y la industria alimentaria. El TiO_2 es uno de los nanomateriales más producidos a nivel mundial. Sin embargo, la IARC (Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer) lo clasificó como un posible carcinógeno, pero la FDA (Agencia de Medicamentos y Alimentos) permite su uso en alimentos y la EFSA (Agencia Europea de Seguridad en Alimentos) clasificó al TiO_2 grado alimenticio como E171. Estudios reportan que las NPs de TiO_2 esféricas atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE), disminuyen el consumo de O_2 y la fosforilación de ADP en mitocondrias de pulmón. Pero al momento no hay estudios que demuestren que E171 atraviese la BHE, ni sus efectos en mitocondrias de cerebro. Por lo que el objetivo es evaluar si los efectos causados por E171 al atravesar la BHE son similares a los causados por NPs TiO_2 esféricas.

Para ello, primero se caracterizó el tamaño de las E171 suspendidas en solución salina y suero de rata (15%) por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y por dispersión dinámica de luz (DLS) así como su potencial Z (Z sizer). Posteriormente, se aislaron mitocondrias de cerebro de rata las cuales se incubaron con E171 durante 45, 60 y 90 min, así como sus respectivos controles. Se realizaron oximetrías, TEM y análisis digital de imagen (ADI), para conocer su actividad respiratoria, su morfología y morfometría, respectivamente. Finalmente, un grupo de ratas se trataron por inyección intravenosa con 1 mg/kg de E171 y luego de 24h se sacrificaron por perfusión y se obtuvieron los cerebros para su procesamiento y adquisición de imágenes por TEM.

Las partículas de E171 en suspendidas en solución salina y suero de rata (15%), formaron aglomerados con un tamaño hidrodinámico de 695.5 ± 141.6 nm y por TEM de 460 nm, con un potencial Z de -38.36 ± 1.57 mV, indicando que la solución fue homogénea en el momento que se utilizó. En cuanto a la actividad mitocondrial, en la primera adición de ADP se registró una disminución en el control respiratorio del 24.62% y 36.28% a los 60 y 90 min de exposición, respectivamente. Lo que indicó una

disminución en el contenido de mitocondrias en buen estado. En cuanto a la relación P:O, existe una disminución del 29.61% a los 90 min. La repolarización aumentó un 38% a los 90 min de exposición. Para la segunda adición de ADP se registró una disminución en el CR de 47.04% a los 45 min de exposición y un 40.28% a los 90 min. La relación P:O disminuyó 23.1% y 21.1% a los 45 y 90 min de exposición, respectivamente, indicando que la cantidad de ADP fosforilado es menor comparado con los controles. El estado 4 aumentó 75.43% a los 45 min de exposición. Por último, la repolarización aumentó un 27.45% y 25.61% a los 45 y a los 90 min, respectivamente. Además se registró un aumento en el área y diámetro mitocondrial a los 45 y 90 min de exposición, indicando que las partículas de E171 comienzan a cambiar la morfología mitocondrial, y una disminución del número de mitocondrias a los 90 min. Por último se encontraron posibles aglomerados de partículas de E171 en corteza cerebral de rata.

Se puede concluir que el E171 está potencialmente disponible para internalizarse tanto en las mitocondrias aisladas, como en cualquier parte del torrente sanguíneo para su posible internalización en la BHE. El daño causado por E171 en la actividad mitocondrial se observó a partir de los 45 min, ya que el valor de CR disminuyó a los 45 min de exposición y este efecto se observó a los 90 min también. Por otro lado, el aumento en el área y diámetro mitocondrial fueron igual de evidentes a los 45 min en donde también se incrementó la distancia entre las crestas mitocondriales. Asimismo, fue evidente la disminución de la cantidad de mitocondrias a los 90 min. En las ratas a las cuales se expuso a una sola dosis, se encontraron posibles aglomerados de E171 en corteza del cerebro, sin embargo se sugiere hacer más estudios para verificar este hallazgo.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Nanotecnología y nanopartículas

La nanotecnología (NT) es el estudio, manipulación y aplicación de la materia a nanoescala, para explorar sus fenómenos y propiedades (Basavaraj, 2012). Incluso es aplicable en la industria alimentaria (Peters *et al.*, 2016), por ejemplo, en envases inteligentes con propiedades para garantizar una mejor protección de los alimentos y también como aditivos (Weir *et al.*, 2012; Khalaj *et al.*, 2016). Por lo tanto, la NT es hasta ahora un campo en rápido desarrollo y dentro de ella, los nanomateriales (NM) son de gran interés económico ya que se ha obtenido un valor dentro del mercado mundial de más de 2 billones de euros en 2010 (Comisión Europea, 2012).

Un NM se define como un material natural, o sintético que contenga partículas, sueltas o en agregado/aglomerado en el que por lo menos el 50 % de las partículas miden entre 1 y 100 nm en una o más de sus dimensiones (Comisión Europea, 2012). Mientras que una nanopartícula (NP) es aquella que mide entre 1-100 nm (Cupaioli *et al.*, 2014).

Dentro de las características más importantes de las nanopartículas (NPs) están el tamaño, ya que entre más pequeña sea la partícula, mas fácilmente será internalizada en los tejidos a mayor profundidad (Sharifi *et al.*, 2012; Luyts *et al.*, 2013), el potencial Z (Fröhlich, 2012; Djurisic *et al.*, 2015) indica que las NPs se encuentran establemente suspendidas en la solución cuando es mayor a ± 30 mV (Hartig *et al.*, 2007) y la geometría, por ejemplo, las cintas de TiO₂ han mostrado ser más tóxicas que las esferas, entre otras (Pal *et al.*, 2007; George *et al.*, 2012; Sadeghi *et al.*, 2012). Estas características llevan a un destino biológico y toxicidad. Por ejemplo, algunos NM a base de metales, pueden liberar iones metálicos que suelen ser tóxicos cuando se disuelven en un medio acuático (Nowack *et al.*, 2007; Kahru *et al.*, 2010; Batley *et al.*, 2012).

Con base en estos y otros parámetros se ha discutido cuales son los mecanismos tóxicos de las NPs. Algunos autores proponen que los principales mecanismos son: 1)

Interacciones físicas de los NM con componentes celulares, 2) la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y estrés oxidante y 3) la liberación de iones provenientes de NP metálicas u óxidos metálicos (Ma *et al.*, 2013; Djuriscic *et al.*, 2015).

1.2. Dióxido de titanio

El TiO_2 fue producido por primera vez en los Estados Unidos por Titanium Pigment Company. En 1925, National Lead Company adquirió un gran interés en Titanium Pigment Company, y la producción alcanzó las 4000 toneladas anuales. Entre 1916 y 2011, se estimaron 165 millones de toneladas de TiO_2 en todo el mundo (Jovanović, 2015). Sin embargo, se estima que la producción global de TiO_2 seguirá aumentando por lo menos hasta el 2025 (Landsiedel *et al.*, 2010). El TiO_2 es utilizado en barnices, esmaltes, plásticos, papel, fibras, alimentos, productos farmacéuticos, y de cuidado personal como cosméticos, y pastas dentales (ICIS, 2017).

Las NPs de TiO_2 son el NM mas producido a nivel mundial (Garduño-Balderas *et al.*, 2015). Las principales fuentes de extracción del TiO_2 son los depósitos minerales. Los cuales se extraen a partir del mineral ilmenita (Jovanović, 2015).

Las formas más comunes de TiO_2 utilizadas en la industria son anatasa y rutilo. Cada uno tiene una forma atómica y cristalina única que les proporciona diferentes propiedades fisicoquímicas (Wilson *et al.*, 2015).

No es posible saber con exactitud la producción de los NM, sin embargo, se estima que rebasa el límite de 1 tonelada por año (Piccinno *et al.*, 2012). Tan solo la producción global de TiO_2 a nanoescala se estimó en 2000 toneladas anuales con un valor de 70 millones de dólares, de éstas aproximadamente 1300 toneladas se utilizaron en productos de cuidado personal hasta el 2005 (EPA, 2009). Sin embargo, a pesar de todos estos usos, la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC), lo tiene clasificado como un posible cancerígeno (grupo 2B) para los humanos cuando la

exposición es por vía inhalatoria (IARC, 2010). Por ello el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH) recomendó que la concentración de este compuesto no exceda los 0.3 mg/m³ en los espacios de trabajo (NIOSH, 2011). Aún así el uso del TiO₂ está permitido por la Agencia de Medicamentos y Alimentos (FDA) y su límite es <1% del peso del producto (FDA, 2017). Asimismo la Agencia Europea de Seguridad en Alimentos (EFSA) lo clasificó como E171 (EFSA, 2005).

1.2.1. Dióxido de titanio como aditivo alimentario (E171)

El TiO₂ empleado a manera de aditivo alimentario, se conoce como E171 en el continente Europeo y en América del norte como INS171 o pigmento blanco No 6 (NOM-243-SSA1-2010; NOM-218-SSA1-2011; Weir *et al.*, 2012). Un aditivo alimentario es una sustancia que se agrega a los alimentos solo para mejorar sus propiedades organolépticas sin aportar ningún valor nutricional (NOM-243-SSA1-2010).

En la Unión Europea, todos los aditivos alimentarios seguros se identifican dándoles la letra E y los números siguientes los pone de acuerdo a su función (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación general de los aditivos alimentarios (números E) por la Unión Europea. Fuente: Codex Alimentarius, 2015; EFSA, 2017.

| Función | Serie |
|--|-----------------|
| Colorantes | E 100 – E 199 |
| Conservantes | E 200 – E 299 |
| Antioxidantes y reguladores acidez | E 300 – E 399 |
| Estabilizantes | E 400 – E 499 |
| Reguladores del pH y agentes antigrumos | E 500 – E 599 |
| Potenciadores del sabor | E 600 – E 699 |
| Varios | E 900 – E 999 |
| Químicos adicionales | E 1000 – E 1300 |

El E171 está conformado por TiO₂ nanométrico y micrométrico, diferentes estudios han aportado una cifra diferente de la cantidad nano y micrométrica del TiO₂. Por ejemplo en

un estudio se demostró mediante análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) que la fracción de NPs oscilaba entre el 19% y el 35% para las muestras de E171 obtenidas de China e Italia (Yang *et al.*, 2014). En otro estudio se demostró, que solo del 10-15% de las partículas tienen un tamaño inferior a 100 nm para las muestras E171 procedentes de proveedores en China, Alemania, Italia, los Países Bajos y el Reino Unido (Peters *et al.*, 2014). Otros estudios mencionan cantidades aún más grandes de E171 (36% de NPs de TiO₂ y el resto de micropartículas, y 54% de NPs) cuyo diámetro promedio en los productos alimenticios es de 110 nm (30-400 nm) (Weir *et al.*, 2012; Faust *et al.*, 2016).

El E171 se encuentra en muchos alimentos, por ejemplo dulces confitados, quesos y salsas, leche desnatada, helados y pasteles, así como en dulces de azúcar donde constituye el recubrimiento de dulces, chicles, vegetales secos, nueces, sopas, mostazas, cervezas y vinos, así como en pastas dentales (Skocaj *et al.*, 2011; Weir *et al.*, 2012; Peters *et al.*, 2014; Bachler *et al.*, 2015).

El TiO₂ grado alimenticio (E171) es un pigmento blanco utilizado como agente colorante, para resaltar el color blanco y el brillo. Cualquiera que sea el tipo de alimento, la adición de TiO₂ se limita al 1% del peso total del producto en los Estados Unidos (FDA, 2017) y en Europa se utiliza en "*quantum satis*", es decir, añadir la mínima cantidad de producto o ingrediente para obtener el efecto deseado (Parlamento Europeo, 1994; EFSA, 2016). Además, en México el E171 es utilizado en harinas, tortillas, helados, quesos frescos y procesados, cremas y dulces, siguiendo las buenas prácticas de manufacturación lo que significa que puede usarse la mínima cantidad requerida de E171 para alcanzar las propiedades que se deseen (NOM-243-SSA1-2010).

La ingesta global del TiO₂ por persona depende en gran parte de la geografía, por ejemplo, en la población adulta de Estados Unidos consumen ~0.2-0.7 mg/kg de peso de TiO₂ y en el Reino Unido consumen aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal de TiO₂ por día. En los niños menores de 10 años se estima que ingieren de 1-2 mg y 2-3 mg de TiO₂/kg por día en los Estados Unidos y el Reino Unido, respectivamente, esto

debido a su menor masa corporal y su mayor consumo de caramelos y dulces en comparación con los adultos (Weir *et al.*, 2012).

Las evaluaciones de toxicidad, realizadas tanto en células epiteliales como en animales, han demostrado que las NPs de TiO₂ esféricas y E171 pueden acumularse en el intestino, pasar a través de la barrera intestinal induciendo toxicidad, genotoxicidad y deteriorar la regulación de la microbiota intestinal (Jani *et al.*, 1994; Böckmann *et al.*, 2000; Gerloff *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2013; Urrutia-Ortega *et al.*, 2016; Bettini *et al.*, 2017).

1.3. Efectos *in vivo* e *in vitro* por la exposición a NPs de TiO₂

Cuando las NPs de TiO₂ esféricas son suministradas por la vía intravenosa, el titanio es detectado en el pulmón y la linfa, y por debajo del límite de detección (<500 ng/órgano) en otros órganos, como el hígado, bazo, riñón y cerebro (Shinohara *et al.*, 2014).

Asimismo, en un estudio *ex vivo* realizado en mitocondrias aisladas de pulmón de rata, se observó que las NPs esféricas de TiO₂ inducen una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, en los niveles de NADH y un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Así como el incremento en: a) la tasa de P:O: nanomoles de ADP fosforilado por átomo de oxígeno consumido; b) repolarización, consumo de oxígeno registrado cuando se añade ADP a las mitocondrias y c) fase de latencia: el tiempo requerido por la mitocondria en consumir el oxígeno presente después de la adición de ADP, lo que demuestra que las NPs de TiO₂ son capaces de inducir una disfunción mitocondrial (Freyre-Fonseca *et al.*, 2011). Además, las NPs de TiO₂ esféricas producen neuroinflamación en rata expuestas a 50, 100, y 200 mg/kg de peso corporal cuando la ingesta es por vía oral (Grissa *et al.*, 2016).

Las NPs de TiO₂ esféricas en su forma anatasa inducen toxicidad en líneas celulares de glía y neurona (D384 y SH- SY5Y, respectivamente), provocando una disfunción mitocondrial, alterando la integridad de la membrana, morfología y proliferación (Coccini

et al., 2015). Además, se ha descubierto que células de la glía son capaces de endocitar a las NPs de TiO₂ esféricas causando efectos tóxicos en estas células, por lo que su acumulación podría ser peligrosa para la salud (Huerta-García *et al.*, 2015). Por otro lado, algunas NPs pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) provocando daños en cerebro que incluso pueden generar tumores (Oropesa-Nuñez y Jáuregui-Haza, 2012).

Asimismo, se demostró que la exposición a NPs de Ag en ratas adultas producen un cambio de sinapsis en la neuronas, principalmente en el hipocampo (Skalska *et al.*, 2015). En un estudio donde se cultivaron astrocitos, se observó que las NPs de CuO incrementaron la generación de ERO (Bulcke *et al.*, 2014).

1.4. Barrera hematoencefálica (BHE).

Las NPs (especialmente de tipo metálico) entran rápidamente en el sistema circulatorio (Oberdörster *et al.*, 2005). Una vez en el torrente sanguíneo, el transporte de NPs puede distribuirse en todo el cuerpo y ser absorbido por tejidos y órganos incluyendo el cerebro, el corazón, el hígado, los riñones, el bazo, la médula ósea y también el sistema nervioso (Oberdörster *et al.*, 2005).

La BHE (Figura 1) se encuentra entre el sistema nervioso central (SNC) y en la orilla de los vasos sanguíneos actuando como una interfaz, protegiendo al cerebro (Mattei y Rehman, 2015). Está compuesta por un endotelio microvascular, astrocitos, lámina basal, pericitos y neuronas (Domínguez, 2014). Sus características estructurales la hacen prácticamente impermeable al agua y a algunos solutos, ya que aíslan y protegen al tejido nervioso cerebral y controlan el paso de sustancias xenobióticas al cerebro (Pardridge, 2007). Es decir, restringe en gran medida el transporte de células y moléculas fuera y dentro del cerebro (Liu *et al.*, 2017). La BHE es permeable únicamente a algunas moléculas como los nutrientes que entran al cerebro, por ejemplo melatonina, ácidos grasos, aminos, además de productos de desecho, hormonas o neurotransmisores que salen del cerebro (Pardridge, 1981). Solo una pequeña cantidad de fármacos es capaz de

atravesarla permitiendo la homeostasis del microambiente químico del SNC (Xu *et al.*, 2007).

La señalización celular es mediada por receptores que están enlazados por uniones estrechas o GAP, que tienen las células endoteliales (Abbott *et al.*, 2010). El conjunto de células endoteliales y las proteínas mencionadas forman parte de la estructura de los vasos sanguíneos, los cuales a su alrededor están cubiertos por pericitos que cubren cerca de un tercio de su superficie y las células gliales llamadas astrocitos, sostienen estos capilares con sus procesos pediculares. Este sistema capilar en el cerebro humano tiene una longitud de 600 km y una superficie de 20 m² (Reichel, 2009). Se ha demostrado que por vía intranasal, las NPs de TiO₂ esféricas atraviesan la BHE y se trasladan a la corteza cerebral, tálamo y al hipocampo (Wang *et al.*, 2008a).

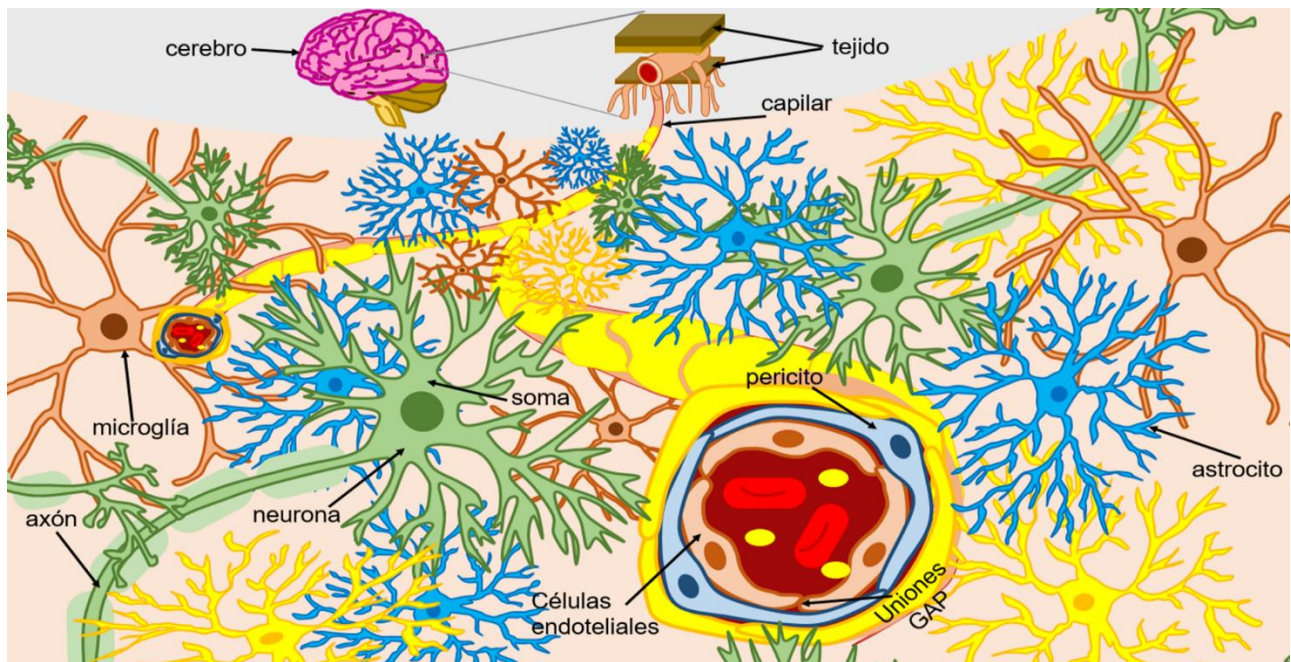


Figura 1. Barrera hematoencefálica (BHE). Se encuentra en el cerebro, formando por una red de capilares, está formada exteriormente por astrocitos (mantenimiento de la función neurona), pericitos (integridad de los vasos sanguíneos) microglía (eliminación de residuos) y neuronas (transmisión de información), e interiormente se encuentra conformada por células endoteliales de los vasos sanguíneos. Figura realizada por Aguilar Olivares Kevin Jair y Lomeli Castillo Jocelyn Lucero.

1.4.1. Cruce de NPs a través de la BHE

Estudios recientes informan que algunas NPs pueden atravesar la BHE a través de diferentes formas (Figura 2) y acumularse en diferentes regiones del cerebro. Algunos mecanismos por los cuales una sustancia puede atravesar la BHE son (Cupaioli *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2016):

- 1) Por transcitosis: Las NPs cargadas positivamente pueden atravesar la BHE debido al contacto de la membrana luminal cargada negativamente.
- 2) Por uniones estrechas: Esta es una vía paracelular (espacios que existen entre los espacios celulares), a través de la cual podrían pasar las NPs de un tamaño menor a 10 nm por medio de monocitos o macrófagos que pueden endocitar a las NPs y cruzar la BHE.
- 3) Transporte mediado por receptores: Las NPs pueden interactuar con receptores (ligandos) específicos por ejemplo; insulina y transferrina, que podrían transportarse a células endoteliales mediante endocitosis y luego por medio de exocitosis al ser excretadas en el cerebro.
- 4) Transporte mediado por acarreadores: Las NPs pueden encontrar proteínas transportadoras por ejemplo; colina, glucosa, nucleósidos y atravesar la BHE.
- 5) Por medio de difusión: la hidrofobia puede permitir que las NPs basadas en lípidos pasen a través de la BHE, pero solo está disponible para moléculas con criterios estrictamente definidos.

Los diferentes procesos de transporte hacia la barrera, permanecen sin conocerse por completo, además de que el proceso de translocación de las NPs en células nerviosas, a lo largo del soma y el axón (Figura 1) debería estudiarse más a fondo para conocer si la superficie de las NPs cambia durante su translocación al SNC (Kang *et al.*, 2016).

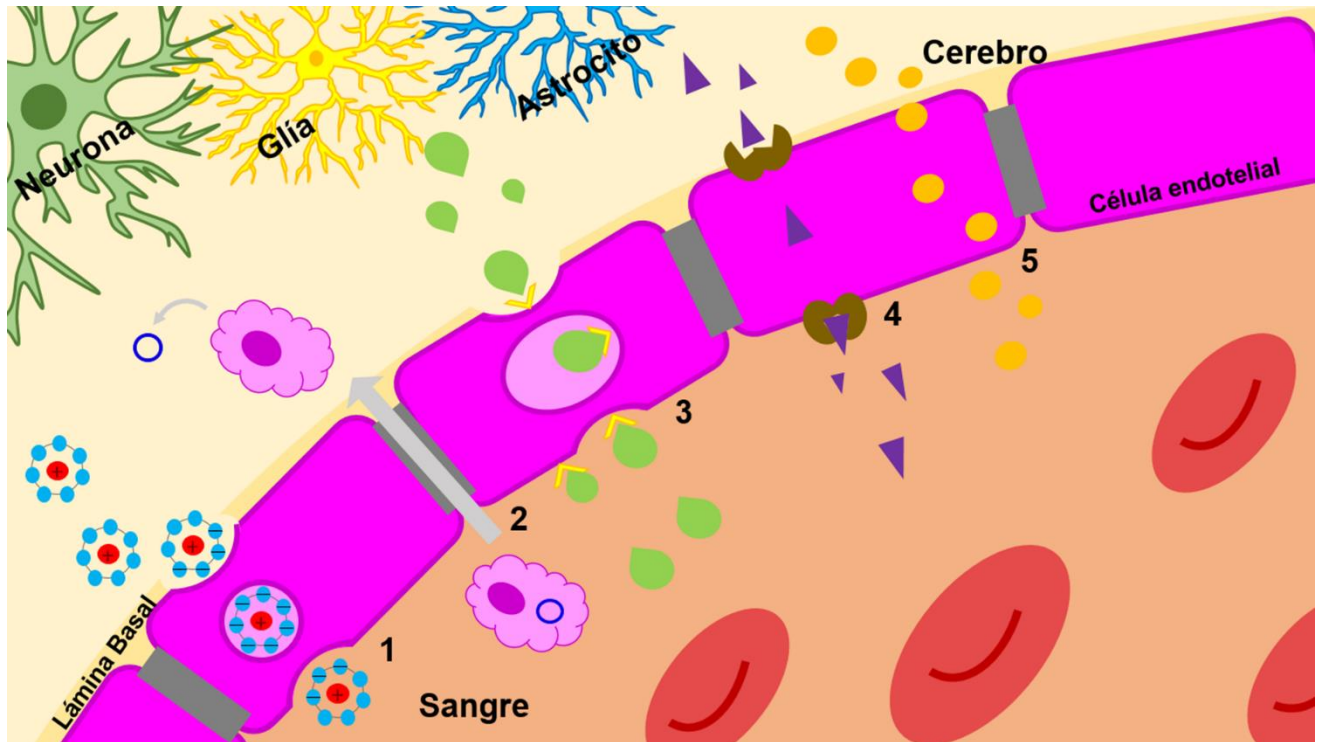


Figura 2. Algunas vías por las que una sustancia puede cruzar la BHE y llegar al parénquima cerebral: **1)** Por cargas; **2)** Por medio de las uniones estrechas; **3)** Mediada por receptores; **4)** Mediada por acarreadores y **5)** Por medio de difusión. Figura realizada por Aguilar Olivares Kevin Jair y Lomeli Castillo Jocelyn Lucero.

1.5. Funcionamiento mitocondrial

Las NPs pueden transportarse al citoplasma e incluso al núcleo y a organelos celulares, como las mitocondrias (Kang *et al.*, 2016). Las mitocondrias producen ATP mediante la transferencia de electrones a lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial (Fariss *et al.*, 2005). Se realiza mediante la fosforilación oxidativa, la cual es el último paso del catabolismo celular, tras la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico. La fosforilación oxidativa ocurre dentro de las crestas de la membrana interna. A partir de la transferencia de electrones del NADH y FADH₂, obtenidos en la glucólisis y en el ciclo de Krebs, a través de los complejos que forman la cadena de transporte de electrones (Karp, 2009). Esta cadena está formada por un conjunto de 4 complejos mitocondriales que funcionan como

catalizadores de reacciones de óxido-reducción, donde el oxígeno (O_2) es el aceptor final de electrones y se genera agua. Esta serie de reacciones se encuentran acopladas con la síntesis de ATP que proporciona la energía a toda la célula (Jiménez y Merchant, 2003). Este proceso se explica mejor de la siguiente manera:

Los electrones entran a la cadena a partir del NADH, donando sus electrones al complejo I, o del $FADH_2$ donando sus electrones al complejo II. Por cada dos electrones donados al complejo I, se bombean 4 protones al espacio intermembranal. Los electrones pasan del complejo I y II a la ubiquinona, la cual se encuentra dentro de la bicapa de lípidos y recorre toda la membrana (Nelson y Cox, 2009). Luego los electrones pasan de la ubiquinona reducida (ubiquinol) al complejo III y después al citocromo c, el cual es móvil. El movimiento de los electrones por el complejo III bombea 4 protones más a través de la membrana (Canosa *et al.*, 2011). Los electrones se transfieren del citocromo c al complejo IV donde se bombea el último lote de protones (4 protones) a través de la membrana. El complejo IV transfiere los electrones al O_2 , que acepta 4 protones de la matriz para formar dos moléculas de agua (Karp, 2009). Se necesitan 4 electrones para reducir cada molécula de O_2 (Figura 3).

La energía liberada en estas reacciones se utiliza para generar un gradiente de protones, el cual se utiliza a su vez para para formar ATP en un proceso llamado quimiosmosis o fuerza protón-motriz. Conforme se mueven los electrones en la cadena, se desplazan de un nivel de energía más alto a uno más bajo, lo que libera energía. Parte de esta energía se utiliza para bombear H^+ lo que los desplaza fuera desde la matriz hacia el espacio intermembranal (Jiménez y Merchant, 2003). Este bombeo establece un gradiente electroquímico. Cuando fluyen por el gradiente de regreso hacia la matriz, los protones pasan a través de una enzima llamada ATP sintasa, la cual aprovecha el flujo de protones y genera ATP a partir de ADP y un grupo fosfato (P_i) (Figura 3) (Karp, 2009).

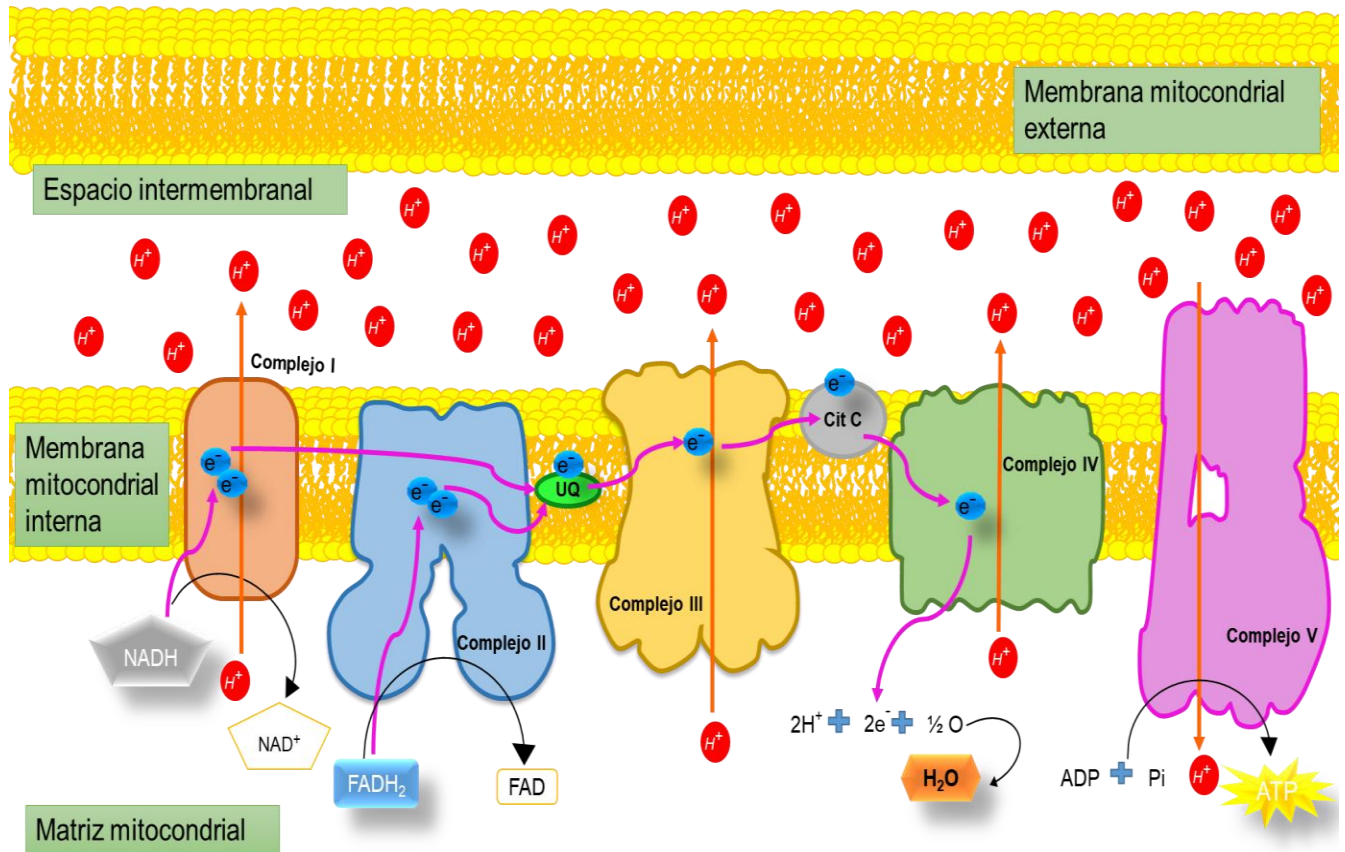


Figura 3. Fosforilación oxidativa en la membrana interna de la mitocondria. Complejo I (NADH deshidrogenasa); complejo II (succinato deshidrogenasa), complejo III (citocromo bc₁), complejo IV (citocromo c oxidasa), complejo V (ATP sintasa), UQ; ubiquinona, y Cit C; citocromo c. La línea morada muestra el flujo de electrones y la naranja de protones a través de la membrana interna. Figura realizada por Aguilar Olivares Kevin Jair y Lomeli Castillo Jocelyn Lucero.

1.6. La mitocondria en el cerebro.

Las mitocondrias desempeñan un papel importante en los procesos respiratorios celulares, el metabolismo, la producción de energía, la señalización intracelular, la producción de radicales libres y la apoptosis (Verdin *et al.*, 2010; Filosto *et al.*, 2011). Además de que son capaces de alterar su morfología, número y función en reacción a los factores estresantes y las condiciones fisiológicas (Verdin *et al.*, 2010).

La morfología de las mitocondrias está controlada por ciclos repetitivos de fusión (reducción de la mezcla mitocondrial) y fisión (aumento de la fragmentación mitocondrial) que son fundamentales para la dinámica mitocondrial (Sharma *et al.*, 2014). La alteración de la dinámica mitocondrial, así como las mutaciones de DNA mitocondrial (Hiona *et al.*, 2010), las mutaciones genéticas (McFarland *et al.*, 2010), alteración de la transcripción contribuyen a la disfunción mitocondrial (Chaturvedi y Beal, 2013) que da lugar a la patogénesis de varias enfermedades (Lin y Beal, 2006; Neustadt y Pieczenik, 2008; Yao *et al.*, 2009).

Muchas líneas de evidencia sugieren que las mitocondrias pueden regular críticamente la muerte celular y la supervivencia, éstas juegan un papel esencial en el envejecimiento y son características clave de la neurodegeneración (Lin y Beal, 2006). En el SNC, el suministro de energía suficiente que requiere la supervivencia neuronal y la excitabilidad depende principalmente de las fuentes mitocondriales; por lo tanto, el cerebro es mucho más vulnerable (Golpich *et al.*, 2015). Por ejemplo la alteración del almacenamiento de energía o del canal de Ca^{2+} , por parte de las mitocondrias o el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden contribuir a la disminución progresiva de las neuronas (Onyango *et al.*, 2010).

La disfunción de los complejos mitocondriales de la cadena de transporte de electrones se ha asociado con la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas crónicas más comunes relacionadas con la edad, como por ejemplo, Alzheimer (AD, por sus siglas en inglés), enfermedad de Parkinson (PD, por sus siglas en inglés), Huntington (HD, por sus siglas en inglés) y esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por sus siglas en inglés) (Beal, 2005; Trushina y McMurray, 2007; Kilbride *et al.*, 2011). El deterioro de la actividad de complejos de la cadena respiratoria mitocondrial se da en los complejos I, III y IV en el caso de AD, la PD se da en los complejos mitocondriales I y IV, la HD ocurre por deficiencia de los complejos II, III y IV y por último la ALS, se da por deficiencia en los complejos mitocondriales I, II, III y IV (Golpich *et al.*, 2017).

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. Justificación

El TiO_2 es un compuesto con diferentes geometrías que otorgan propiedades variadas. Se ha reportado que las NPs de TiO_2 esféricas, pueden atravesar la BHE, almacenarse en diferentes zonas del cerebro y provocar un mal funcionamiento mitocondrial. Mientras que el TiO_2 (E171) es una mezcla de partículas poligonales, de tamaños macroscópicos y microscópicos que se utiliza como aditivo para alimentos. Si estas convergen en el torrente sanguíneo, podrían llegar hasta el cerebro. Pero no se sabe si, al igual que las NPs de TiO_2 esféricas, las partículas E171, pueden atravesar la BHE y ocasionar efectos similares que las NPs de TiO_2 esféricas. Lo cual justifica su estudio.

3. Hipótesis

Si las NPs de TiO_2 esférico atraviesan la BHE y modifican el funcionamiento mitocondrial, entonces dado que las partículas E171 son el mismo compuesto pero de diferente tamaño y forma, atravesarán la BHE y causarán efectos similares al TiO_2 esférico.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Determinar si el TiO_2 grado alimenticio (E171) es capaz de atravesar la BHE y estudiar los efectos del mismo en mitocondrias de cerebro aisladas y expuestas a E171 a intervalos de tiempo.

4.2. Objetivos específicos

- 1) Caracterizar las partículas E171 en solución salina y suero de rata.

- 2) Evaluar la actividad respiratoria de las mitocondrias aisladas de cerebro de rata expuestos directamente a 1 mg/kg de E171 durante un tiempo corto, mediano y largo (45, 60 y 90 min).
- 3) Determinar los cambios morfológicos de mitocondrias aisladas de cerebro de rata ocasionados por las E171
- 4) Localizar las zonas cerebrales en las que las E171 son acumuladas cuando se inyectan vía intravenosa en rata.

MATERIALES Y MÉTODOS

5. Materiales y Métodos

5.1. Materiales

5.1.1. Programas

Los programas Image J, V. M. 1.46 (NIH, Estados Unidos); GraphPad Prism 5, 2007; O₂ view versión 2.05 Copyright © 2013 fueron utilizados para este trabajo.

5.1.2. Reactivos

Partículas E171 donadas por Sensient Colors México, Tris base (Sigma-Aldrich, No. Cat. TI503-1KG, Estados Unidos), EDTA (Sigma-Aldrich, No. Cat. E4884-500G, Estados Unidos), Sacarosa (Sigma-Aldrich, No. Cat. S7903-1KG, Estados Unidos), HEPES (Sigma-Aldrich, No. Cat. H7006-25G, Estados Unidos), KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, No. Cat. P2222-500G, Japón), Taurina (Sigma-Aldrich, No. Cat. T8691-25G, Japón), Ácido lactobiónico (Sigma-Aldrich, No. Cat. L2398-100G, India), EGTA (Sigma-Aldrich, No. Cat. E4378-25G, Estados Unidos), MgCl₂·6H₂O (Sigma-Aldrich, No. Cat. M2393-100G, Alemania), BSA (MP. Biomedicals, LLC, No. Cat. 160069, Francia), Percoll (Sigma-Aldrich, No. Cat. P1644-100ML, Estados Unidos), Piruvato (Sigma-Aldrich, No. Cat. P5280-25G, Japón), Malato (Sigma-Aldrich No. Cat. M1000-100G, China), ADP (Sigma-Aldrich, No. Cat. A2754-1G, Estados Unidos), Glutaraldehído (Electron Microscopy Sciences, No. Cat. 16400, Estados Unidos), NaH₂PO₄·H₂O (Fermont, No. Cat. 35942, México), NaH₂PO₄ (J. T. Baker, No. Cat. 3828-19, México), KOH (J. T. Baker, No. Cat. 314601, Suecia), HCl (J. T. Baker, No. Cat. 9535-05, México), solución salina (PISA, No. Lote D16A327, México), Pentobarbital sódico (Pisabental de laboratorios Pisa agropecuario, No. Cat.1016446, México).

5.1.3. Animales

Para el trabajo completo se utilizaron 30 ratas Wistar macho de 250-300 gr, las cuales estuvieron divididas, de acuerdo con los requerimientos de cada objetivo; para cubrir el objetivo 1 se utilizaron 15 ratas, para cubrir el objetivo 2 fueron utilizadas un total de 10 ratas y para cumplir con el objetivo 3 fueron requeridas 5 ratas.

5.2. Métodos

5.2.1. Caracterización de partículas E171 en solución salina y suero de rata

Las muestras de E171 suspendidas en solución salina y 15% suero de rata se diluyeron 1:7 (3.43×10^{-3} mg/ μ l) y se sonicaron durante 30 min a 40 Hz. Las partículas de E171 en suspensión fueron caracterizadas por medio de la lectura de su potencial Z, tamaño hidrodinámico y por TEM. Dichas evaluaciones se realizaron por medio del medidor Zeta Plus (Brookhaven, USA) y el Z sizer nano (NS, Malvern, UK) a 25°C respectivamente, los cuales funcionan a través de dispersión dinámica de luz. Así como la morfología de los aglomerados en suspensión por medio de la microscopía electrónica de transmisión (TEM JEOL-JEM 1010).

5.2.2. Evaluación de la actividad respiratoria de las mitocondrias aisladas de cerebro de rata expuestas a E171

5.2.2.1. Preparación de partículas de E171 para oximetrías

Las partículas de E171 (1mg) fueron disueltas en 100 μ l de solución salina con 15 % de suero de rata. Posteriormente, la solución fue sonicada durante 30 min a 40 Hz. Ésta solución se mantuvo a temperatura ambiente hasta su utilización y solo se agitó momentos antes de su administración en la preparación de mitocondrias aisladas.

5.2.2.2. Manipulación de animales

Las ratas fueron manipuladas siempre con cuidado pero con firmeza, procurando su seguridad. La lucha y el estrés se evitaron ya que la excitación prolongada puede alterar la circulación y el estado metabólico del individuo e inducir un estado de choque.

La eutanasia se realizó por medio de decapitación sin ningún anestésico conforme al punto 9.5.3.3 de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, ya que esta técnica permite obtener tejidos y fluidos corporales libres de contaminación química. Una vez obtenida la cabeza de rata se extrajo el cerebro.

5.2.2.3. Obtención de cerebro de rata

Tijeras de tamaño medio se utilizaron para hacer una incisión en la línea media del pelo a partir del borde de corte creado por la guillotina y terminando en la zona entre los ojos. Se retrajo el cuero cabelludo de la superficie del cerebro y se utilizaron unas pinzas (alicates) para quitar las partes del cráneo y músculo asegurándose de minimizar los daños al cerebro. Se hizo una incisión en el hueso entre las cuencas de los ojos en el puente nasal con tijeras medianas, para retirar el hueso restante hacia los lados. Se levantó la parte inferior del cerebro con ayuda de una espátula y se cortaron las meninges con tijeras de disección finas. Se sacó el cerebro deslizando el extremo redondeado de la espátula entre la superficie ventral del cerebro y el cráneo levantándolo cuidadosamente (Sims y Anderson, 2008). Se aisló el hemisferio derecho de cerebro de rata con una navaja nueva de un solo filo, para la extracción de mitocondrias.

5.2.2.4. Extracción de mitocondrias de cerebro de rata

Una vez extraído el hemisferio derecho de cerebro de rata, se pesó para calcular la cantidad de buffer de aislamiento en el que se sumergió. El tejido se lavó y cortó en

pedazos de aproximadamente 3 mm³ y se homogeneizó con un potter. El homogeneizado se centrifugó a 1300 xg a 4° C por 3 min, el sobrenadante (A) se recuperó. Al pellet, se le agregó más buffer de aislamiento, se homogeneizó y se centrifugó a 1300 xg 4° C por 3 min. De dicha centrifugación se separó el sobrenadante (B). Posteriormente, ambos sobrenadantes (A y B), se juntaron y se centrifugaron a 21000 xg a 4°C por 15 min. A partir de esto, el sobrenadante se desechó y se hicieron 3 gradientes de percoll (15, 23 y 40%) con el pellet. Se eliminaron las dos primeras bandas y la 3er banda se recuperó y se agregaron 4 volúmenes de buffer de aislamiento. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 16700 xg a 4°C por 15 min. Se eliminó el sobrenadante y al pellet se le agregaron 0.5 ml de Albumina Sérica Bovina (BSA) más 2.5 ml de buffer de aislamiento y se centrifugó a 6900 xg a 4°C por 10 min. El pellet de mitocondrias se resuspendió en 110 µl de buffer de aislamiento (Sims y Anderson, 2008) (**Anexo I**).

5.2.2.5. Exposición de mitocondrias de cerebro de rata a partículas E171.

Una vez extraídas las muestras, se midió la proteína mitocondrial por medio de un espectrómetro (**Anexo II**), posteriormente se realizaron los cálculos para obtener 1mg de proteína mitocondrial (**Anexo III**) y se hicieron alícuotas de las mismas las cuales fueron organizadas en 6 grupos de tratamiento:

- a) Mitocondrias + 1mg E171 incubadas durante 45 min
- b) Control (mitocondrias sin tratar) incubadas 45 min
- c) Mitocondrias + 1mg E171 incubadas durante 60 min
- d) Control (mitocondrias sin tratar) incubadas 60 min
- e) Mitocondrias + 1mg E171 incubadas durante 90 min
- f) Control (mitocondrias sin tratar) incubadas 90 min

Transcurridos estos tiempos de exposición se midió el consumo de oxígeno utilizando un electrodo de tipo Clark conectado a una cámara con agitación magnética en un medio de respiración.

5.2.2.6. Determinación de la función respiratoria

A las mitocondrias aisladas del hemisferio derecho de cerebro de rata se le adicionaron dos concentraciones diferentes de ADP (0.14 y 0.36 mM), para observar que tan acopladas estaban al estimular el consumo de oxígeno en la cadena respiratoria y la síntesis de ATP, conociendo así la función respiratoria de la mitocondria. La función respiratoria se compone de distintos parámetros: control respiratorio; estado 3; estado 4; relación P:O; fase lag y repolarización. Los datos de los trazos del consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas del hemisferio derecho de cerebro de rata se obtuvieron por medio del programa O₂ view versión 2.05 de Hansatech Copyright © 2013 (**Anexo VI**). Los cuales fueron procesados mediante una hoja de Excel para obtener los valores de cada parámetro en cada una de sus unidades correspondientes.

El control respiratorio (CR) es la capacidad que tiene la mitocondria para regular la velocidad para el transporte de electrones al adicionar ADP y en ausencia del mismo y representa la relación entre el estado 3 y el estado 4 (pendientes). El estado 3 y estado 4 se obtuvieron cuando se añadió ADP a la muestra mitocondrial, es decir, al adicionar ADP (estado 3) se estimula el consumo de oxígeno que conlleva a una reducción en la concentración de O₂ en el medio hasta regresar a un estado basal (estado 4), el cual representa la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia de ADP (Figura 4). También se obtuvo la relación P:O, que es la cantidad de nanátomo de oxígeno (O₂) consumido por nanomoles de ATP sintetizado en ese estado 3. Asimismo se calculó la fase lag, la cual indica el tiempo requerido por la mitocondria en consumir el O₂ presente después de la adición de ADP. Y por último se obtuvo la repolarización, la cual es el consumo de O₂ registrado cuando se añade ADP a la muestra mitocondrial.

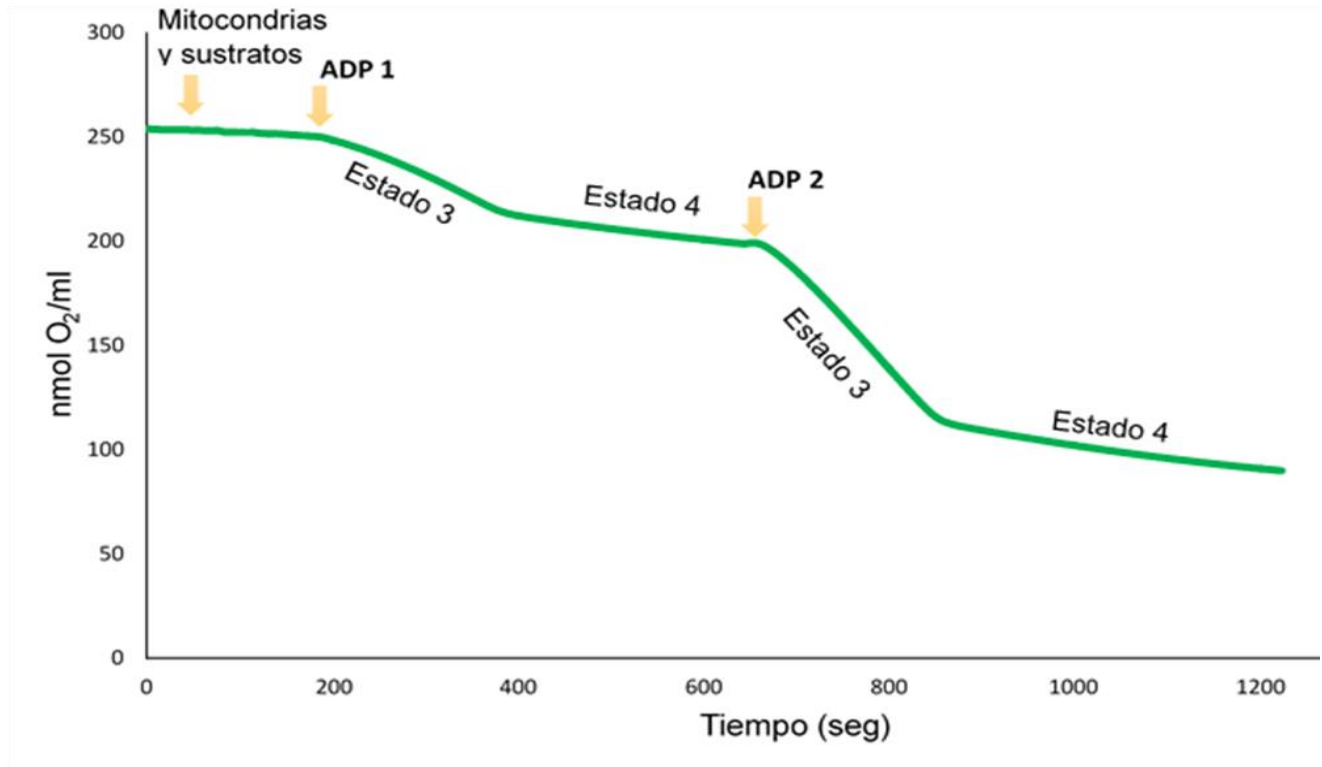


Figura 4. Gráfico representativo del consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de cerebro de rata. Se muestran los estados 3 y 4 (con flechas) que marcan el cambio de la pendiente con la adición de diferentes concentraciones de ADP (1 y 2). Figura realizada por Lomeli Castillo Jocelyn Lucero.

5.2.3. Cambios morfológicos de mitocondrias ocasionados por las E171.

5.2.3.1. Extracción de mitocondrias para estudios de morfología

La extracción de mitocondrias de cerebro de rata se realizó de la misma manera redactada en el punto 5.2.2.4. Posterior a su extracción, se mezcló 1 mg de proteína mitocondrial con 1mg de E171. Se incubaron durante 45, 60, 90 min. También se realizaron los grupos control (sin E171) a sus respectivos tiempos. Una vez pasado este lapso se procesaron las muestras para observarlas mediante TEM.

5.2.3.2. Adquisición de imágenes de mitocondrias por microscopia electrónica de transmisión.

Las muestras mitocondriales con y sin E171 se fijaron con 500 µl de glutaraldehído al 2.5%, una vez que ocurrió su tiempo de incubación y se dejaron reposar dos horas más. Pasadas estas dos horas, se centrifugaron a 5000 rpm durante dos minutos, se eliminó el sobrenadante y se adicionó 500 µl de solución PBS Sorensen (3 lavados). Estas muestras se resuspendieron suavemente y se guardaron a 4° C hasta antes de iniciar la deshidratación.

Las muestras suspendidas en PBS Sorensen se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min y se añadieron 500 µl de una solución lavadora compuesta por buffer de fosfatos Sorensen y sacarosa. Se centrifugaron durante 5 minutos a 10,000 rpm y se añadió 500 µl de la solución lavadora. Se post-fijaron con tetraóxido de osmio 2% y con amortiguador de fosfatos Sorensen. Posteriormente se lavaron 3 veces durante 10 y 5 min de centrifugación a 10,000 rpm y se añadieron diferentes diluciones de alcohol etílico en orden ascendente de 10 a 90% centrifugando en intervalos de 10 min. Se continuó con la deshidratación con alcohol etílico al 100% por 24 h y se repitió 3 veces la operación, se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min y se añadió óxido de propileno con etanol 1:2 y se dejó reposar 1 h. Posteriormente se lavaron y añadieron gradientes de óxido de propileno y etanol (1:1, 2:1, propileno puro) seguido de otro gradiente de óxido de propileno y resina (2:1, 1:1, 1:2, resina pura) dejando 1h entre cada lavado. Se montaron en celdas de cobre y se observaron por TEM para adquirir las imágenes, (cortes de 70 nm, aumentos de 40 000 y 25 000 x) (Figura 5).

5.2.3.3. Análisis Digital de Imagen (ADI)

La imagen obtenida de TEM fue segmentada utilizando el software Image J, V. M. 1.46 (NIH, Estados Unidos), el cual es un programa de procesamiento digital de imagen de dominio público programado en Java. Las imágenes originales fueron segmentadas y convertidas a 8-bit (binarizada), en las cuales se midieron el área, el diámetro y el número

de mitocondrias por campo. Se analizaron un total de 6 campos de cada tratamiento (control y tiempo de exposición) (**Anexo V**).

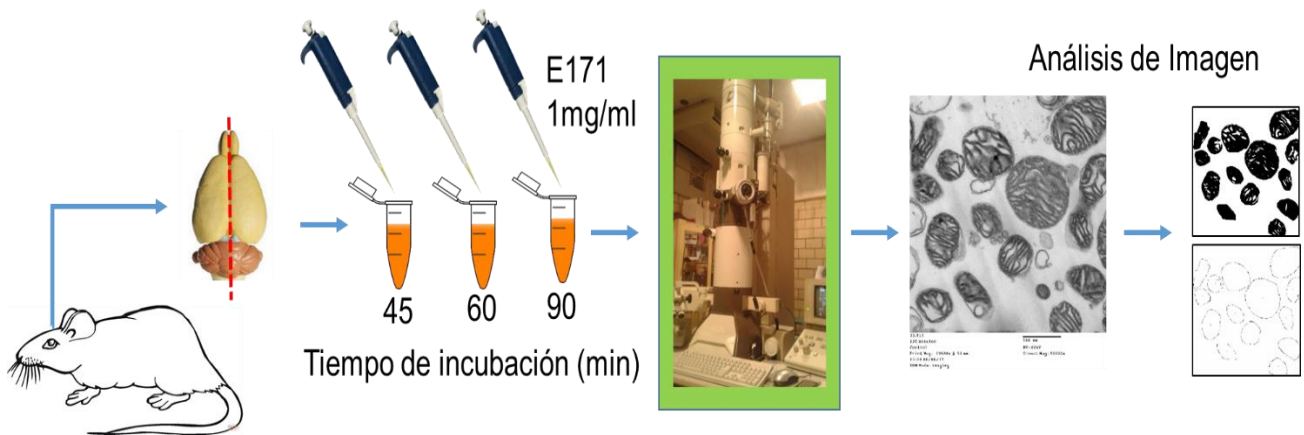


Figura 5. Imagen representativa del procesamiento para obtener el ADI de mitocondrias de cerebro de rata.

5.2.4. Obtención de zonas cerebrales en las que las E171 son acumuladas cuando se inyectan vía intravenosa.

5.2.4.1. Inyección intravenosa a ratas Wistar.

Las ratas se pesaron para administrar 1mg de E171/kg de peso corporal. Las partículas fueron previamente suspendidas en solución salina (NaCl 0.9%) con suero de rata (15%) y sonicadas por 30 min a 40Hz. Se administraron por medio de inyección intravenosa en la vena caudal de la rata. La aguja se colocó formando un ángulo de 45° en relación a la cola de la rata y se insertó sólo unos pocos milímetros avanzando suave y firmemente por la vena caudal (**Anexo IV**). Se utilizó una cámara de acrílico (Figura 6) para evitar que el animal se moviera bruscamente y tener facilidad para manipular la cola.

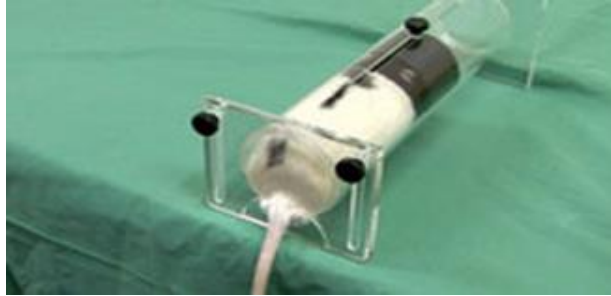


Figura 6. Cámara de acrílico para inmovilizar a las ratas durante la inyección intravenosa de E171 por la vena caudal.

5.2.4.2. Mantenimiento de animales

Posterior al tratamiento con partículas de E171 administradas por vía intravenosa por la vena caudal, los animales se mantuvieron en cajas metabólicas de piso y paredes sólidas con techo removible de rejilla que está diseñado para facilitar el bienestar del animal. Además de satisfacer las necesidades de la investigación y reduciendo las variables experimentales con alimento y agua *ad libitum*. Se utilizó una fórmula nutricional constante y certificada en cuanto a su composición de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999.

Las consideraciones bioéticas para el cuidado de los animales estuvieron basadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Se mantuvieron 3 ratas por caja, esto cumpliendo con el espacio mínimo establecido para ratas de 200-300 g que es de 187 cm² por organismo. Los animales se mantuvieron a una temperatura de entre 18° y 26° C con un porcentaje de humedad del 40% al 70%. La ventilación funcionó ininterrumpidamente las 24 horas del día permitiendo el intercambio de aire ambiental que cubre un intervalo de 15 a 18 recambios de aire por hora. El control de los ciclos de luz se efectuó por medio de uso de relojes interruptores automáticos, ajustados de acuerdo con las necesidades de los animales en cuestión.

5.2.4.3. Sacrificio de los animales

La rata se anestesió con pentobarbital sódico (dosis letal con 0.7 ml por rata, peso de 250 a 300 g) administrada mediante inyección intraperitoneal. Posteriormente, se sujetó por las extremidades para abrir el tórax y exponer el corazón, en el cual, se hizo un pequeño corte en el ventrículo izquierdo, (punta del corazón) cuando aún estaba latiendo el corazón. Se sujetó firmemente y se introdujo una aguja en él, sin dañar a la arteria aorta ascendente (una aguja de calibre 0.80 mm y 10 mm de largo con un émbolo en la punta). La cual se sujetó firmemente con una pinza de mosca. En seguida se hizo un corte lo suficientemente grande para que drenaran las soluciones sin ofrecer resistencia ni demasiada presión en el sistema circulatorio. Posteriormente, se hizo pasar solución fisiológica (sol. salina al 0.9%, 250 ml. aprox. para un espécimen de 250 gr. de peso aprox.) hasta que se vio que la solución saliera sin sangre. La velocidad de perfusión fue regulada para evitar una presión excesiva y ruptura de todos los capilares más delgados (Daneman *et al.*, 2010).

El equipo utilizado fue: una bomba peristáltica (cool-parmer, masterflex) conectado a un gabinete regulador de velocidad (cool-parmer, masterflex) a través de mangueras (masterflex) que permitían el paso del líquido por medio de una llave reguladora de plástico (masterflex). Posteriormente las ratas fueron decapitadas con tijeras de pollero para extraer el cerebro.

5.2.4.4. Disección de cerebro de rata y zonas cerebrales

La extracción de cerebro de rata se realizó de la misma manera redactada en el punto 5.2.2.3. Esta vez procurando realizar el mínimo daño al cerebro. Una vez extraído el cerebro, se diseccionó la corteza, el hipocampo y tálamo, colocando el cerebro sobre una caja petri la cual se mantuvo sobre hielo y con ayuda de un microscopio estereoscópico se diseccionaron las zonas cerebrales. Al cerebro de rata se le retiró el bulbo olfatorio, el cerebelo y parte del tronco cerebral por medio de cortes coronales.

Posteriormente, se le realizó un corte transversal justo a la mitad (Figura 7) separando los dos hemisferios (derecho e izquierdo), quedando descubiertas las zonas internas del cerebro. La corteza, hipocampo y tálamo se diseccionaron con apoyo de la Figura 8, con ayuda de un bisturí y pinzas de relojero del no. 5 en fragmentos de 2-3 mm³.

5.2.4.5. Procesamiento de zonas cerebrales para TEM.

Las zonas extraídas fueron sumergidas en una solución de glutaraldehído al 2.5% en el cual permanecieron cerca de 1 semana. Posteriormente, se decantó esa solución y se añadió un buffer de cacodilato de sodio. Seguidamente, se decantó dicha solución y se utilizó una solución lavadora compuesta por buffer de fosfatos Sorensen ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y NaHPO_4) y sacarosa, para posteriormente fijarlos con tetraóxido osmio 2.5% y con amortiguador de fosfatos Sorensen. Se lavaron 3 veces, se añadió alcohol etílico en orden ascendente de 10 a 90% lavando en intervalos de 10 min. Se continuó con la deshidratación con alcohol etílico al 100 % por 24 h y se repitió 3 veces la operación, se decantó la solución y se añadió óxido de propileno con etanol 1:2 y se dejó reposar 1h. Posteriormente se lavaron y añadieron gradientes de óxido de propileno y etanol (1:1, 2:1, propileno puro) seguido de otro gradiente de óxido de propileno y resina (2:1, 1:1, 1:2, resina pura) dejando 1h entre cada lavado. Por último, se realizaron cortes ultrafinos de 70 nm de grosor a las muestras previamente incluidas en resina epóxica para finalmente montarlas en celdas de cobre (Mesh 100) para observarlas en el microscopio electrónico de transmisión (TEM Jeol Jem-1010) y se adquirieron las imágenes (Figura 9).

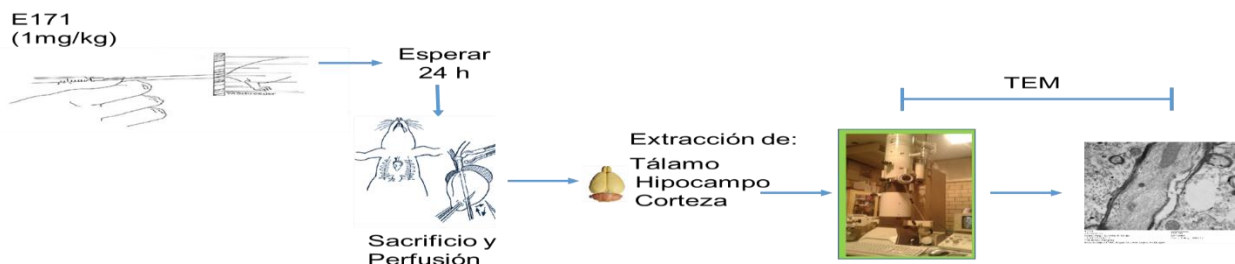


Figura 7. Imagen representativa del procedimiento para obtener imágenes por TEM de zonas específicas de cerebro de rata.

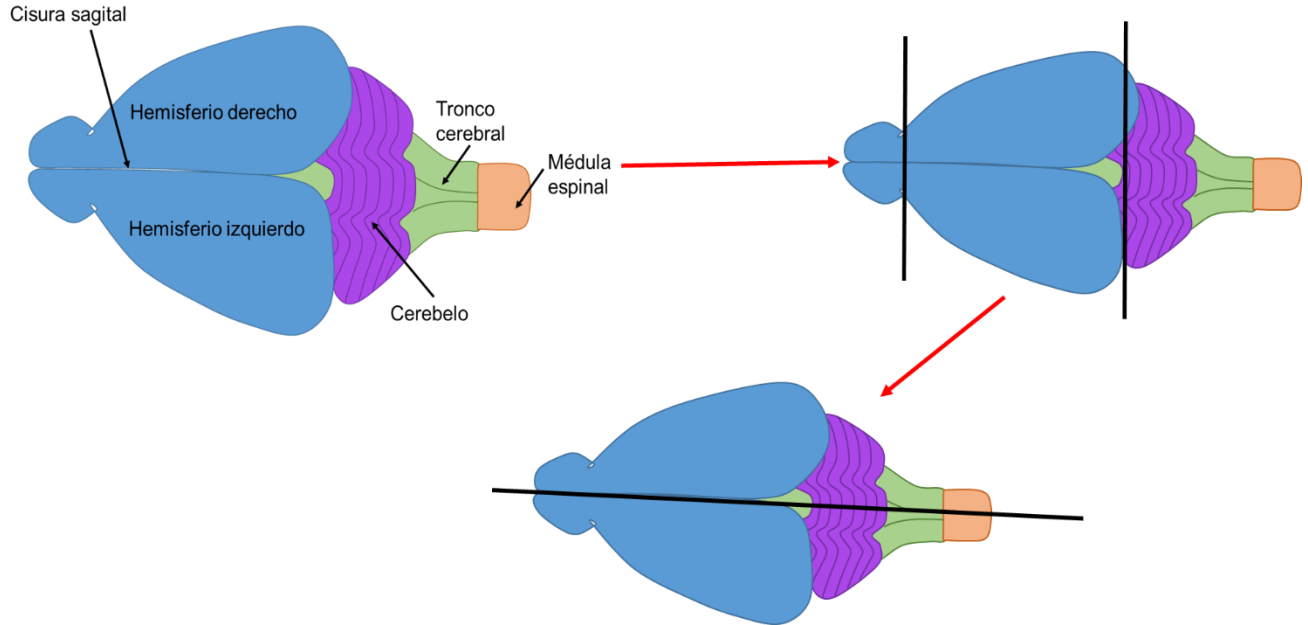


Figura 8. Imagen representativa del procedimiento para obtener el hemisferio derecho de cerebro de rata. Se realizan cortes coronales y uno sagital. Figura realizada por Aguilar Olivares Kevin Jair y Lomeli Castillo Jocelyn Lucero.

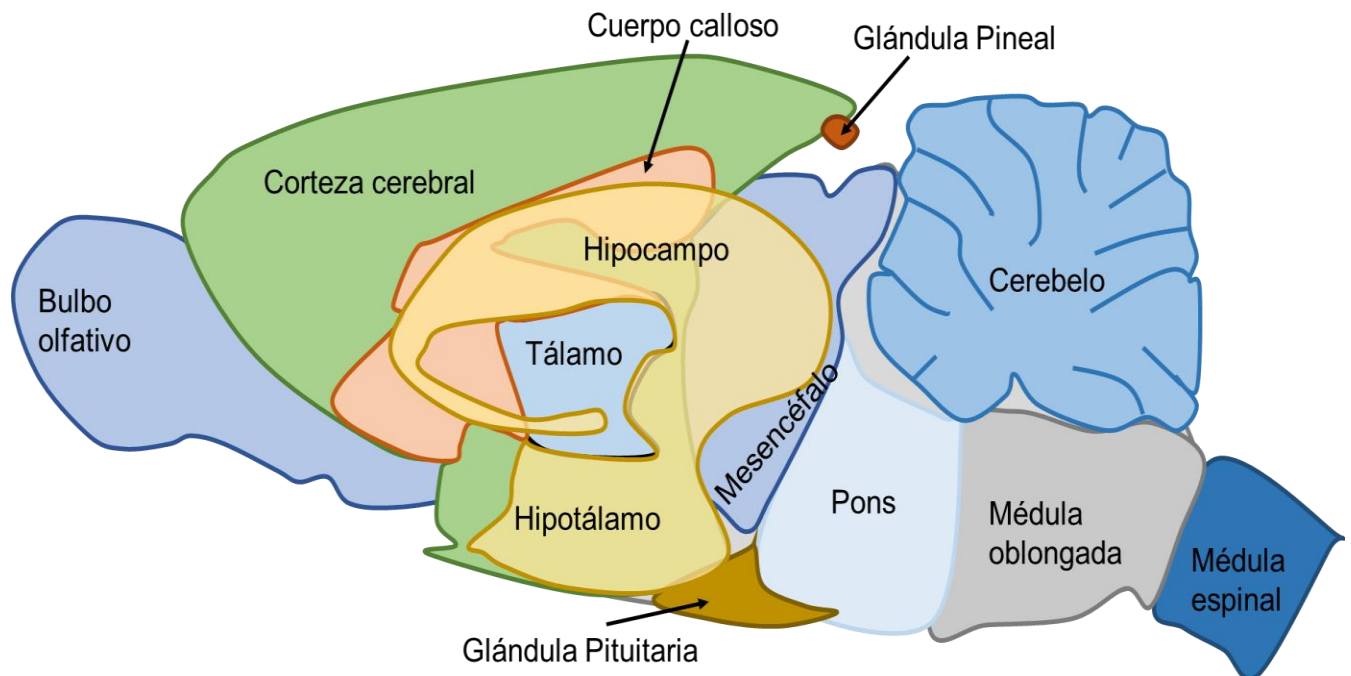


Figura 9. Imagen de apoyo para localizar las zonas cerebrales de rata en un corte sagital. Figura realizada por Aguilar Olivares Kevin Jair y Lomeli Castillo Jocelyn Lucero.

La descripción de los métodos mencionados se pueden resumir en la Figura 10.

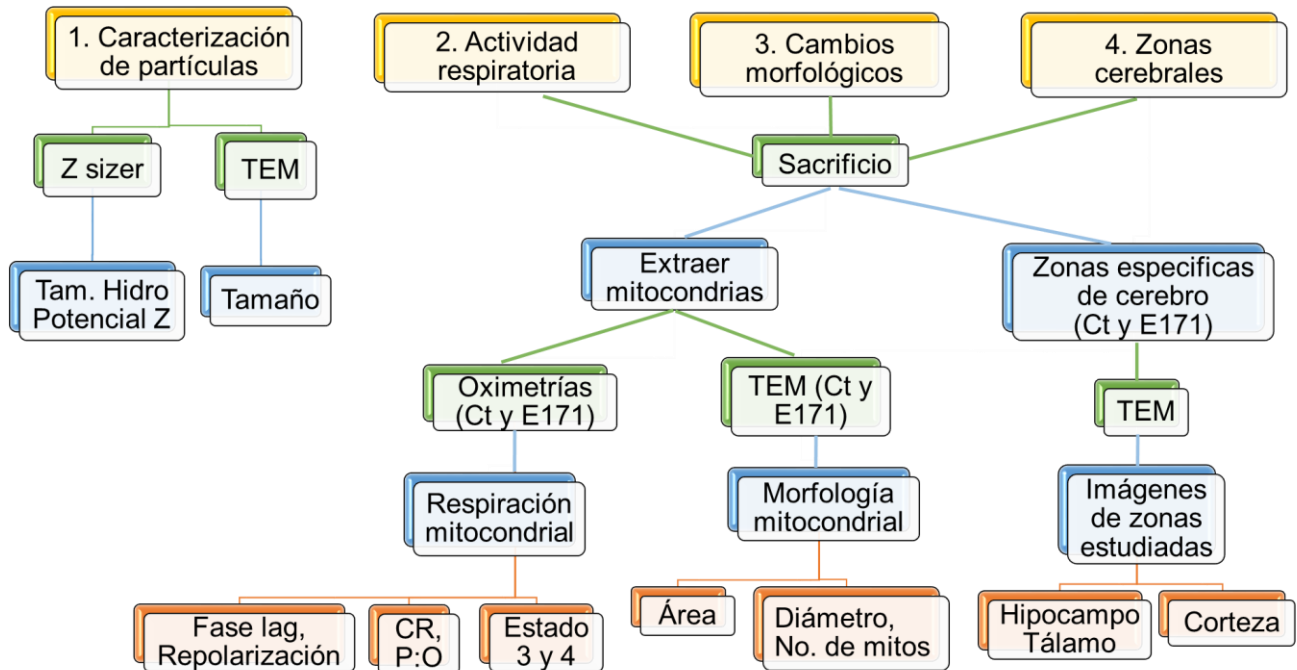


Figura 10. Estrategia metodológica en resumen de las actividades realizadas. Figura realizada por Lomeli Castillo Jocelyn Lucero.

5.2.5. Análisis estadísticos

Los datos del análisis de imágenes y de la función respiratoria fueron expresados con su media y desviación estándar \pm SD. Los grupos fueron comparados inicialmente con un análisis unidireccional de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de T de student para ver diferencias entre medias de cada par de tratamiento (tiempo control y tiempo de exposición). El número de repeticiones para este trabajo fueron de 5 para la función respiratoria y 6 repeticiones para el análisis de imagen. Las diferencias de $*p < 0.05$ fueron consideradas significativas. El análisis, así como los gráficos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5, 2007.

RESULTADOS

6. Resultados

6.1. Caracterización de las partículas E171

El tamaño de los aglomerados de partículas de E171 medidos por diámetro hidrodinámico es de 695.5 ± 141.6 nm, con un índice de poli-dispersión de 0.733, mientras que por TEM es de 460 nm y un potencial Z de -38.36 ± 1.57 mV. Se puede apreciar la forma poligonal de las partículas primarias que forman el aglomerado de E171 (Figura 11)

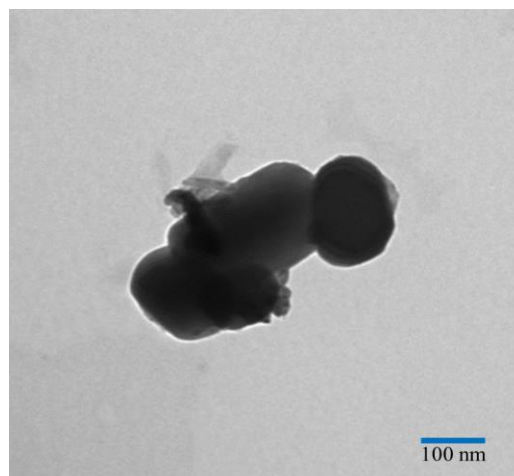


Figura 11. Microscopía electrónica de transmisión de un aglomerado de E171 suspendido en solución salina y 15% suero de rata sonicado 30 min a 40 Hz (75,000X).

6.2. Evaluación de la actividad respiratoria de las mitocondrias aisladas de cerebro de rata expuestas a E171

Los valores iniciales (CR., P:O, estado 3, estado 4, repolarización y fase lag) de las muestras mitocondriales sin transcurrir ningún tiempo aislamiento se muestran en la Tabla 2. Además en **Anexo VI** se pueden apreciar trazos representativos del consumo de O₂ de mitocondrias aisladas de cerebro de rata tratadas con y sin partículas de E171 durante los diferentes tiempos de exposición.

Tabla 2. Parámetros iniciales de la función respiratoria de mitocondrias aisladas del hemisferio derecho de cerebro de rata sin tratamiento. Se muestran los valores cuando se adicionaron las diferentes concentraciones de ADP (0.14 y 0.36 mM).

| Parámetro | Valor (ADP, 0.14mM) | Valor (ADP, 0.36mM) |
|--|---------------------|---------------------|
| Control Respiratorio | 3.12 | 4.72 |
| P:O | 1.49 | 2.04 |
| Estado 3 (nmol/min⁻¹mg⁻¹) | 127.85 | 214.30 |
| Estado 4 (nmol/min⁻¹mg⁻¹) | 41.48 | 45.76 |
| Repolarización (nmol O₂) | 47.50 | 91.26 |
| Fase lag (min) | 5.68 | 5.81 |

Posteriormente, se midieron los mismos parámetros que en la Tabla 2 pero para los diferentes tiempos de exposición con las partículas de E171 y después de la adición de ADP a dos concentraciones: 0.14 y 0.36 mM.

En la primera adición de ADP (0.14 mM) a las muestras mitocondriales control y tratadas con E171 durante diferentes tiempos de exposición (45, 60 y 90 min), se obtuvieron los datos mostrados en las Tablas A1 y A3 del **Anexo VII**, donde se observan los valores de los diferentes parámetros de la función respiratoria y sus promedios correspondientes.

A partir de las gráficas de los datos de las tablas A1 y A3, se observaron diferencias significativas en las cuales hubo una disminución del 24.62% y 36.28% en el CR a los 60 y 90 min de exposición, respectivamente. Es decir, que de un valor promedio de CR 3.9 bajó a 2.94, a los 60 min. Mientras que a los 90 min, el CR bajó de 4.47 a 2.85. En la relación P:O a los 90 min de exposición a E171 existió una disminución de 29.61%, ya que de un valor promedio en la relación P:O de 2.02, bajó a 1.42. En el estado 3 y 4 no se obtuvieron diferencias significativas. En la repolarización existió una diferencia a los 90 min de exposición con un aumento del 38.88 % ya que de un promedio de 35.54 subió a 49.36, sin embargo en la fase lag no se obtuvo diferencia entre los grupos (Figura 12).

Se adicionó una segunda concentración de ADP, para saber si con una concentración de 0.36 mM de ADP se obtenía el doble a comparación de cuando se añadían 0.14 mM

de ADP. Se observó que solo ciertos parámetros fueron los que marcaron el doble con 0.14mM. Las mitocondrias control mostraron que con una doble adición de ADP, los parámetros de CR, estado 3 y repolarización fueron muy cercanos a 2 (>1.6) en todos los tiempos, mientras que la relación P:O, estado 4 y fase lag no mostraron valores cercanos a 2 (Tabla 3). Mientras que en las mitocondrias tratadas con E171, los valores de CR y estado 3 en todos los tiempos disminuyeron a comparación del control. Se observó que en las mitocondrias tratadas, la repolarización sí presentó una doble actividad, es decir, un valor de 2 o superior en todos los tiempos de exposición al igual que en los controles (Tabla 4).

Al igual que en la primera adición de ADP, se obtuvieron valores de la función respiratoria al adicionar una segunda concentración mayor de ADP (0.36 mM) mostrados en las Tablas A2 y A4 del **Anexo VII**. Una vez graficados estos parámetros se registró una disminución del 47.04 % y 40.28% en el CR a los 45 y 90 min, respectivamente. Es decir, que de un valor promedio de CR 7.8, bajó a 4.1 a los 45 min, mientras que a los 90 min el CR cambió de 7.8 a 4.66. En la relación P: O se registró una disminución del 23.1 % y 21.1% a los 45 y 90 min de exposición, respectivamente. Lo cual significa que el valor de la P: O cambió de 2.18 a 1.67, a los 45 min y de 2.07 a 1.63 a los 90 min. En el estado 3 y la fase lag no hubo diferencias significativas, sólo en el estado 4 hubo un aumento del 75.43 %, a los 45 min. Es decir, que el promedio del valor del estado 4 subió de 32.8 a 57.5. En la repolarización se registró un aumento del 27.45 % a los 45 min (de 83.95 a 107) y 25.61 % a los 90 min (de 88.06 a 110.6) (Figura 13).

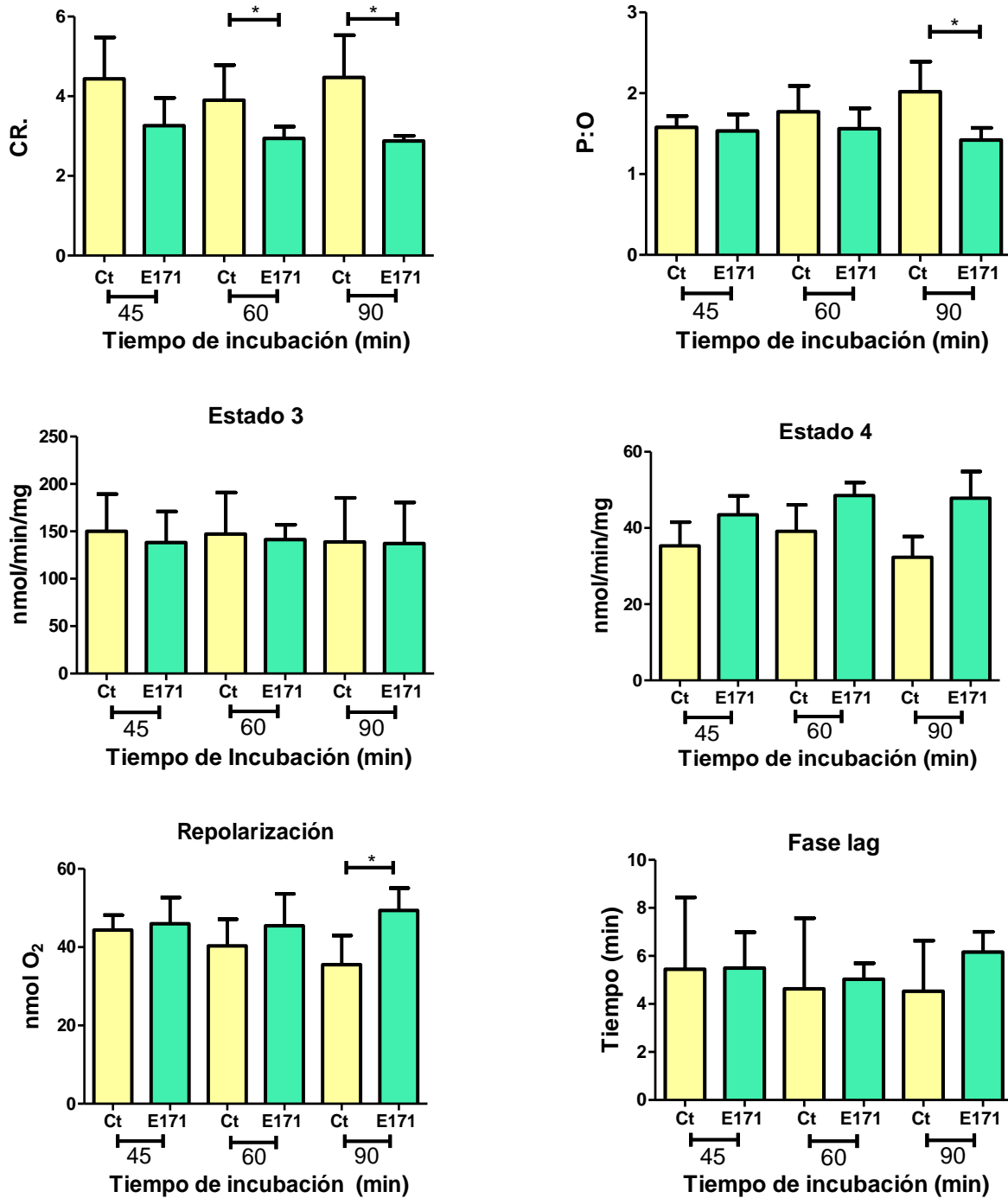


Figura 12. Consumo de O₂ de mitocondrias aisladas de cerebro de rata, incubadas con 1mg de E171/mg proteína a diferentes tiempos de exposición (45, 60 y 90 min), en la primera adición de ADP (0.14 mM). Se muestran diferencias significativas de *p < 0.05 vs su respectivo control, ± desviación estándar (SD), n=5.

Tabla 3. Valores control de las dos adiciones de ADP (ADP1= 0.14 mM y ADP2= 0.36 mM) de mitocondrias aisladas del hemisferio derecho de cerebro de rata de todos los parámetros de la función respiratoria en cada tiempo. Además se muestra si existe una duplicidad en los valores al adicionar el doble de ADP.

| Control | ADP1 | ADP2 | Relación |
|---------------------|--------|--------|----------|
| CR, t45 | 4.44 | 7.80 | 1.76 |
| CR, t60 | 3.90 | 8.10 | 2.08 |
| CR, t90 | 4.47 | 7.82 | 1.75 |
| P:O, t45 | 1.58 | 2.18 | 1.38 |
| P:O, t60 | 1.77 | 1.95 | 1.10 |
| P:O, t90 | 2.02 | 2.08 | 1.03 |
| Estado 3, t45 | 150.14 | 262.49 | 1.75 |
| Estado 3, t60 | 147.22 | 267.25 | 1.82 |
| Estado 3, t90 | 138.75 | 281.29 | 2.03 |
| Estado 4, t45 | 35.32 | 32.80 | 0.93 |
| Estado 4, t60 | 39.13 | 33.41 | 0.85 |
| Estado 4, t90 | 32.33 | 37.01 | 1.14 |
| Repolarización, t45 | 44.37 | 83.95 | 1.89 |
| Repolarización, t60 | 40.30 | 94.51 | 2.35 |
| Repolarización, t90 | 35.54 | 88.07 | 2.48 |
| Fase lag, t45 | 5.44 | 6.20 | 1.14 |
| Fase lag, t60 | 4.63 | 6.79 | 1.47 |
| Fase lag, t90 | 4.53 | 5.96 | 1.32 |

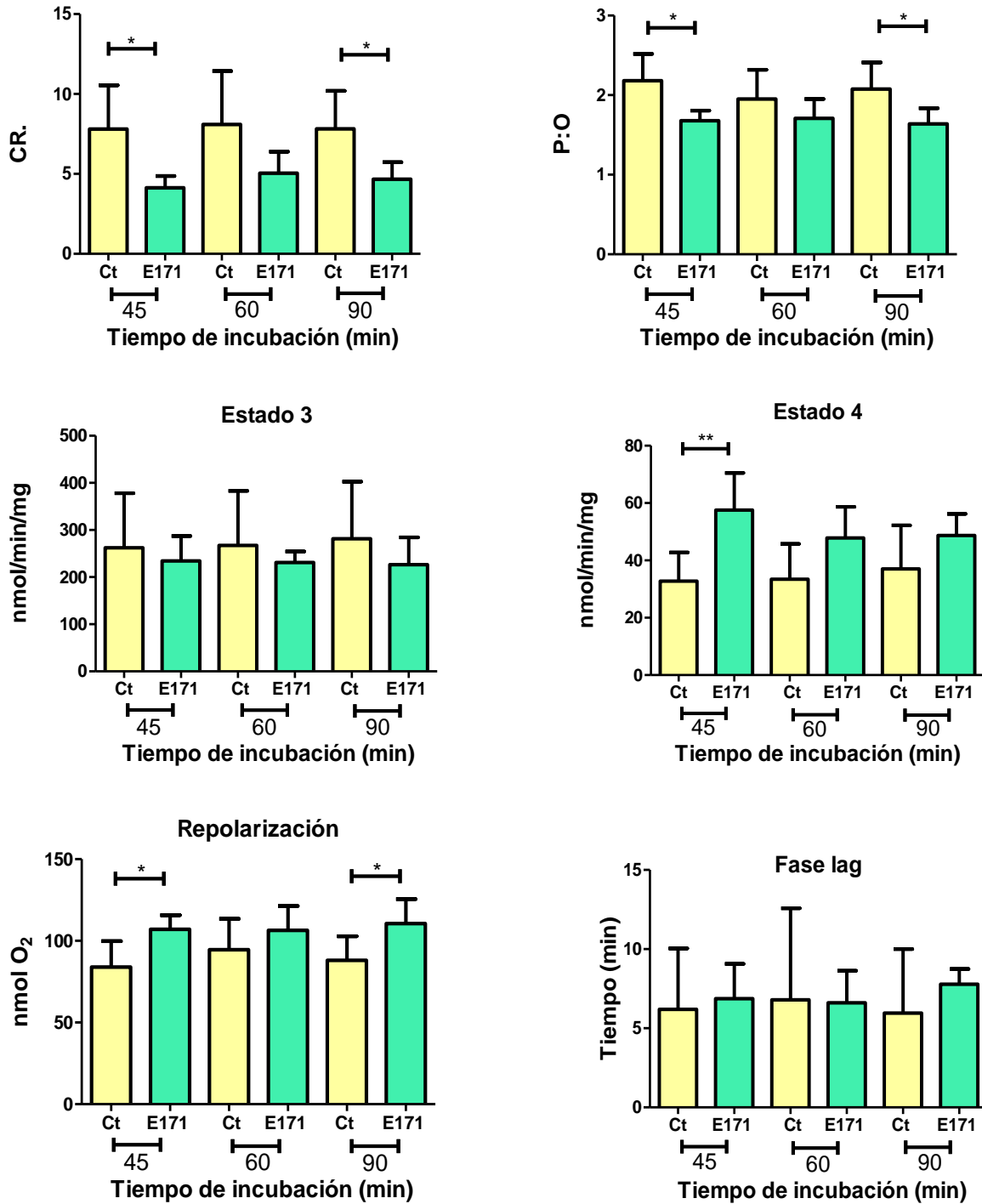


Figura 13. Consumo de O₂ de mitocondrias aisladas de cerebro de rata, incubadas con 1mg de E171/mg proteína a diferentes tiempos de exposición (45, 60 y 90 min), con la segunda adición de ADP (0.36 mM). Se muestran diferencias significativas de *p < 0.05 vs su respectivo control, ± desviación estándar (SD), n=5.

Tabla 4. Valores de las dos adiciones de ADP (ADP1= 0.14 mM y ADP2= 0.36 mM) de mitocondrias aisladas del hemisferio derecho de cerebro de rata tratadas con E171 en todos los parámetros de la función respiratoria en cada tiempo de exposición (45, 60 y 90 min). Además se muestra si existe una duplicidad en los valores al adicionar una concentración mayor de ADP.

| Con E171 | ADP1 | ADP2 | Relación |
|---------------------|--------|--------|----------|
| CR, t45 | 3.26 | 4.13 | 1.27 |
| CR, t60 | 2.94 | 5.04 | 1.71 |
| CR, t90 | 2.88 | 4.66 | 1.62 |
| P:O, t45 | 1.53 | 1.68 | 1.09 |
| P:O, t60 | 1.56 | 1.71 | 1.09 |
| P:O, t90 | 1.42 | 1.64 | 1.15 |
| Estado 3, t45 | 138.24 | 234.45 | 1.70 |
| Estado 3, t60 | 141.37 | 230.99 | 1.63 |
| Estado 3, t90 | 137.20 | 226.56 | 1.65 |
| Estado 4, t45 | 43.47 | 57.54 | 1.32 |
| Estado 4, t60 | 48.50 | 47.82 | 0.99 |
| Estado 4, t90 | 47.85 | 48.70 | 1.02 |
| Repolarización, t45 | 45.98 | 107.00 | 2.33 |
| Repolarización, t60 | 45.49 | 106.40 | 2.34 |
| Repolarización, t90 | 49.36 | 110.62 | 2.24 |
| Fase lag, t45 | 5.49 | 6.87 | 1.25 |
| Fase lag, t60 | 5.03 | 6.61 | 1.31 |
| Fase lag, t90 | 6.17 | 7.78 | 1.26 |

6.3. Cambios morfológicos de mitocondrias ocasionados por las E171

Con las TEM de mitocondrias aisladas de hemisferio derecho de cerebro de rata se observó que conforme pasó el tiempo de exposición, la forma de las mitocondrias aisladas y tratadas con E171 se modificó, es decir, se observa que existe más espacio entre las crestas (Figura 14). Mientras que en las mitocondrias control (sin E171) aparentemente de forma visual la forma permaneció sin cambios, pues en la mayor parte de las mitocondrias el espacio entre las crestas se conservó.

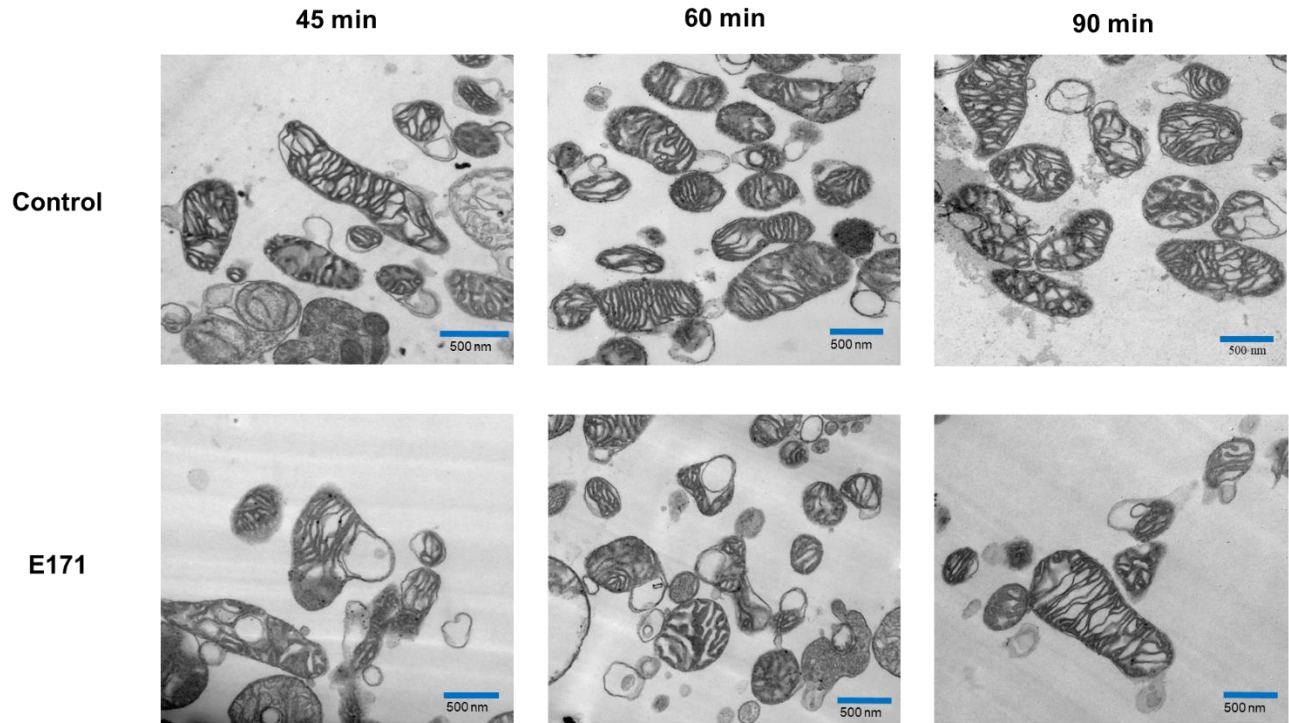


Figura 14. Imágenes TEM de mitocondrias de cerebro de rata incubadas durante 45, 60 y 90 min, con 1mg de E171/mg de proteína mitocondrial, con sus respectivos controles. 40000 X.

6.3.1. Análisis digital de imágenes: Morfometría mitocondrial, después del tratamiento con E171

Se demostró que el área aumentó un 36.77% a los 45 min de exposición. Mientras que hubo una disminución del 19.92% del área a los 60 min. En cuanto al diámetro no se observaron diferencias significativas, pero a los diferentes tiempos de exposición, se observó el mismo comportamiento que lo reportado con el área. Además, el número de mitocondrias se redujo 42.63% a los 90 min de exposición (Figura 15A y B).

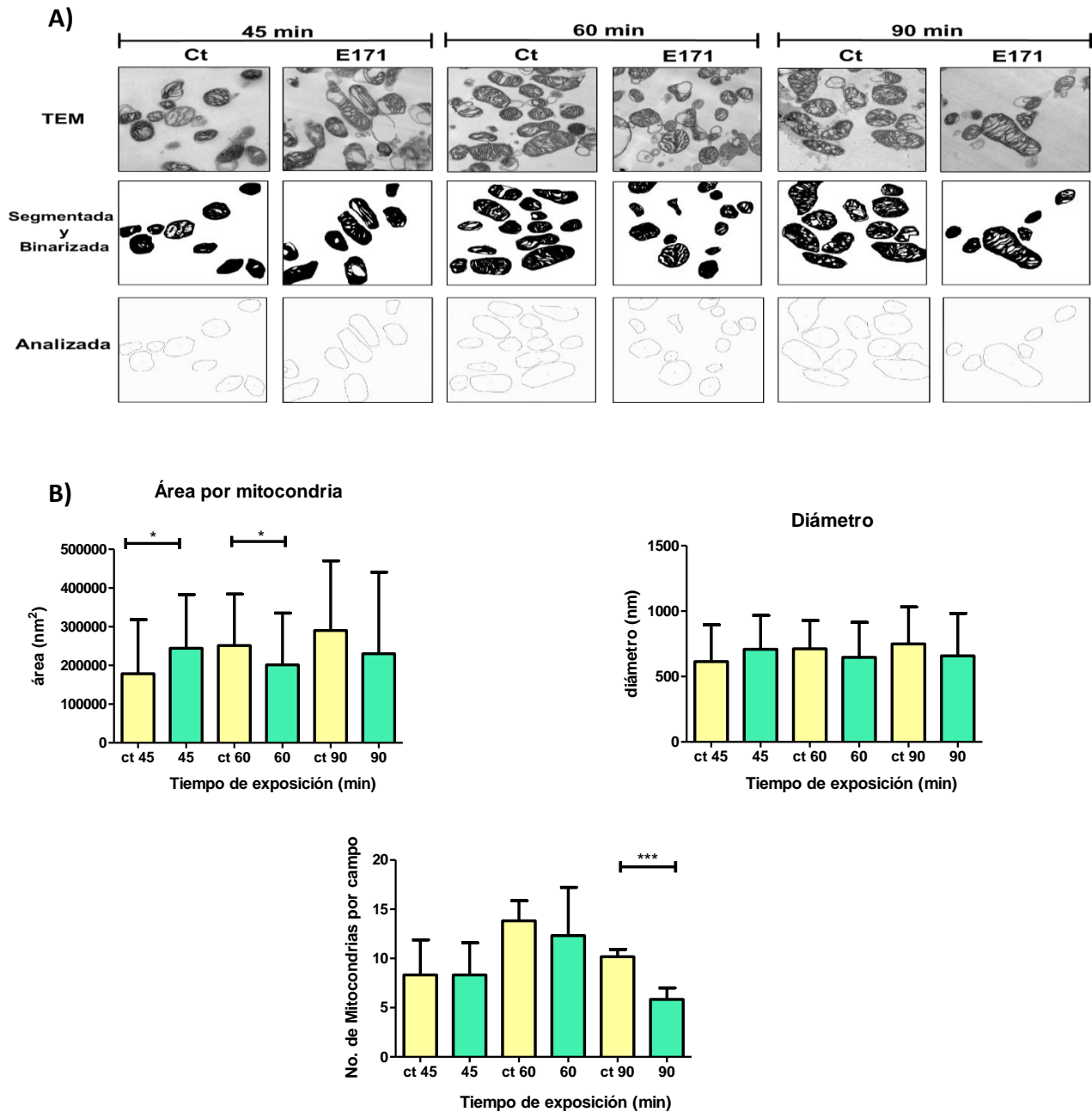


Figura 15. Cambios morfológicos y morfométricos de las mitocondrias aisladas de cerebro de rata, incubadas con E171 a diferentes tiempos. **A)** Secuencia de segmentación, binarización y análisis, de la mitocondrias analizadas digitalmente utilizando el software Image J. **B)** Parámetros morfométricos y cuantificación por campo. Se analizaron las imágenes mediante análisis digital de imágenes. Se muestran diferencias significativas de * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ contra su respectivo control, \pm desviación estándar (SE), $n=6$.

6.4. Ubicación cerebral de las E171 acumuladas

No se detectaron partículas de E171 en hipocampo y tálamo. Sin embargo, en la corteza cerebral de rata tratada con E171 se observaron manchas oscuras y densas en varios campos tomados por TEM. Se muestra una imagen representativa de estos campos en la Figura 16. En la cual, en la parte lateral izquierda (flecha verde) se observa un posible aglomerado de partículas de E171, que tiene un tamaño y forma diferente a lo encontrado en las otras imágenes de las otras zonas (hipocampo y tálamo), que parece haber roto una membrana mitocondrial. Sin embargo, es necesario realizar otro tipo de experimentos para confirmar la presencia de estas partículas en el cerebro (Figura 16).

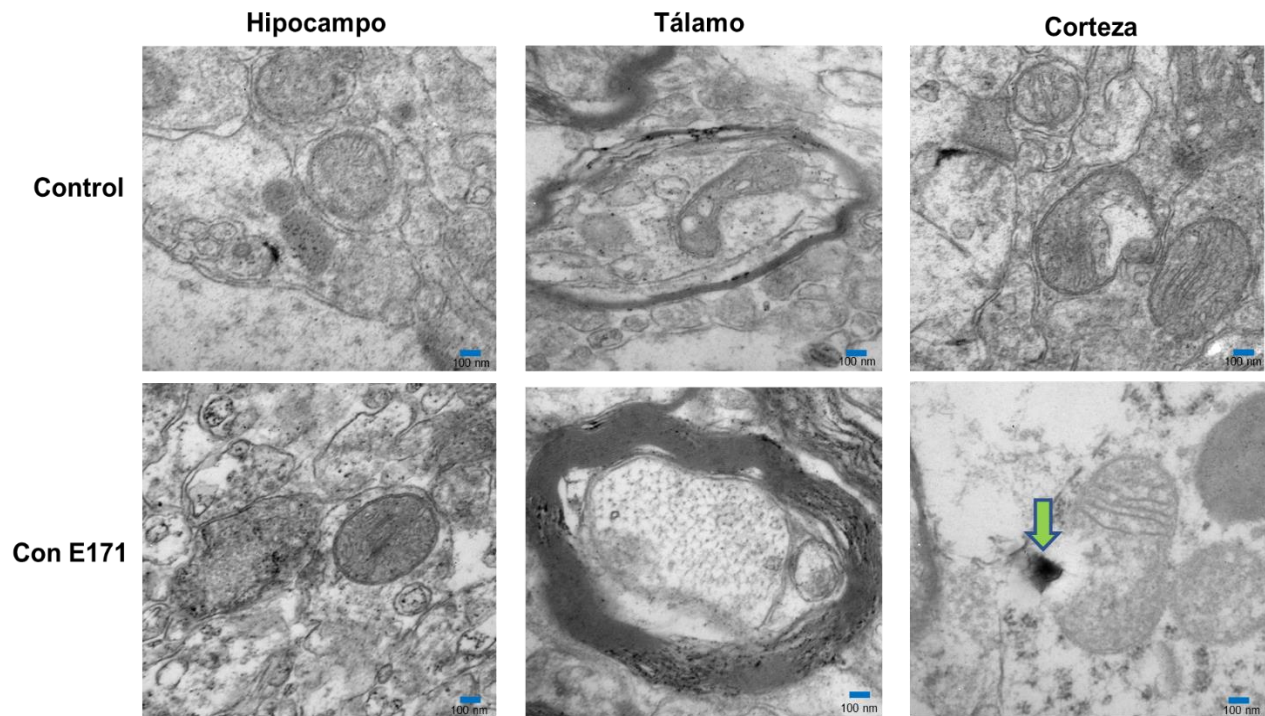


Figura 16. Cortes de cerebro de rata de hipocampo, tálamo y corteza; de ratas control y ratas tratadas 24h antes con 1mg/kg de E171 por vía intravenosa. La flecha verde indica lo que quizá sea un aglomerado de E171. Barra de escala de 100 nm.

Del conjunto de imágenes tomadas por TEM de la zona de la corteza cerebral, se encontraron campos donde se muestra un acercamiento de unos posibles aglomerados de partículas de E171 cuya superficie presentada es muy similar a una imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM) de un aglomerado de partículas de E171 la cual fue adquirida anteriormente y donada por una compañera del laboratorio 10 de la UBIMED de la FES-I, para comparar este posible hallazgo (Figura 17). Los posibles aglomerados de partículas de E171 presentan diferentes tamaños registrado por TEM de 985 nm, 1468 nm y 881 nm, las dos primeras a lo largo del posible aglomerado y la última medición fue el ancho más grande observado en la Figura 17 A.

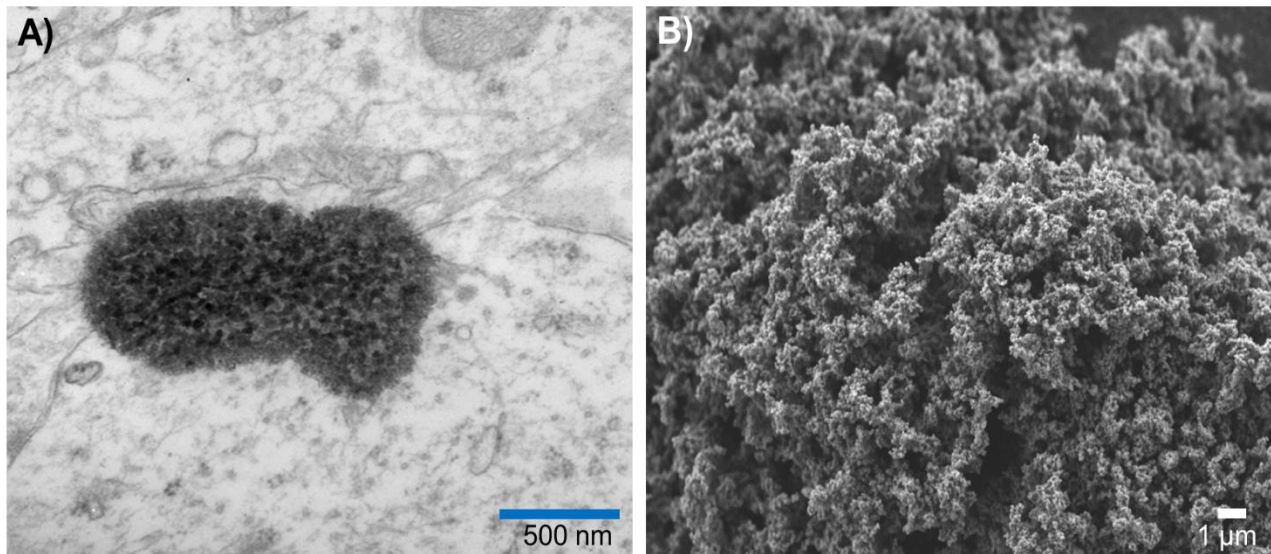


Figura 17. Imágenes de microscopías de E171. A) microscopía electrónica de transmisión de la corteza cerebral de una rata tratada 24h previas con 1mg/kg de E171 y B) microscopía electrónica de barrido de un aglomerado de E171 seco.

DISCUSIÓN

7. Discusión

7.1. Caracterización de las partículas

Un punto importante para conocer el daño que un compuesto puede provocar en el cerebro es saber si es capaz de atravesar la BHE. Para ello, es necesario conocer el tamaño, forma y estabilidad de los aglomerados de las NPs en un medio semejante al cerebro. Se ha reportado que diferentes NPs han sido capaces de atravesar la BHE. Por ejemplo, el SiO₂, que por TEM presentan un tamaño de 20 ± 6.34 nm, pero un tamaño hidrodinámico (DLS) de 169.7 ± 2.08 nm indujo la disfunción de la BHE en un modelo *in vitro*. Esto también se comprobó utilizando un modelo *in vivo* al tratar ratas Sprague-Dawley con 50 mg/kg de NPs de SiO₂ por inyección intraperitoneal durante 28 días consecutivos (Liu *et al.*, 2017). En un estudio, en el que se utilizaron aglomerados de NPs de TiO₂ esféricas de 520.9 ± 41.7 nm diámetro (Disdier *et al.*, 2015), las NPs fueron capaces de atravesar la BHE, sin que se afectara la integridad de las células endoteliales de la BHE.

En el presente trabajo, el tamaño hidrodinámico de los aglomerados de E171 fue 695.5 ± 141.6 nm, tan solo un poco mayor que el reportado por Disidier *et al.*, 2015 con NPs de TiO₂ esféricas y por TEM de 460 nm, aún menor a lo reportado anteriormente, por lo que podría pensarse que estos aglomerados de E171 podrían atravesar la BHE de la misma forma que lo hacen las NPs de TiO₂ esféricas.

En la literatura se ha reportado que la formación de aglomerados ocurre debido a que las NPs se introducen en un medio biológico, lo cual incrementa el tamaño de las mismas (Bruno *et al.*, 2014). Además de que los efectos de las NPs dependen del tamaño de los aglomerados y de la fuerza iónica de la solución en la que se encuentren (potencial Z) (Zhang *et al.*, 2012). Las partículas de E171 presentan un potencial Z de -38.36 ± 1.57 mV lo que indica que son estables en el medio de administración formado por solución salina, un medio inocuo ampliamente aceptado para experimentación y suero de rata, constituido en gran parte por albúmina sanguínea, para simular en lo posible el medio

del torrente sanguíneo. Esto quiere decir que las E171 estuvieron disponibles para viajar libremente por la sangre y distribuirse por todo el organismo, en donde llegan a formar uniones entre la albúmina y el TiO_2 . Lo anterior fue demostrado por Chibber y Ahmad en el 2016 en cuyo estudio, se determinó que las NPs de TiO_2 se unen a la albúmina de suero humano en el sitio 1, es decir en el sitio IIA de esta proteína, mediante puentes de hidrógeno a los O_2 de los residuos de aminoácidos tirosina, arginina y serina de la albúmina. Las NPs convergen en el sistema digestivo, una vez allí atraviesan las microvellosidades del intestino delgado y así pueden pasar al torrente sanguíneo (Jung *et al.*, 2000) y distribuirse en todo el organismo. Lo anterior, proporciona una mayor facilidad de distribución del E171 en el organismo a través del torrente sanguíneo. En un estudio realizado en el 2014 en el cual se administró 2.3 mg de NPs de TiO_2 a ratas por vía intravenosa se detectó que este se distribuyó a varios órganos como hígado, bazo, riñón, pulmón, corazón, y también al cerebro (Geraets *et al.*, 2014). Por otra parte NPs de óxido de zinc, de forma hexagonal, también fueron detectadas en el cerebro por vía oral, a una concentración de 536 mg/kg durante 13 semanas (Cho *et al.*, 2013).

7.2. Actividad respiratoria de las mitocondrias

La mitocondria es un organelo que tiene diversas funciones en la célula, como el control de la actividad respiratoria celular, la generación de ERO, ATP y la regulación de diversas cascadas de señalización. Además en la mitocondria se llevan a cabo diversas vías metabólicas como el ciclo de Krebs y la beta-oxidación de los ácidos grasos que ocurren en la matriz mitocondrial. Por ello se le conoce como el “La planta de energía de la célula” (Nelson y Cox, 2009). Es decir, si la mitocondria se encuentra dañada, la célula se encontrará en peligro (Milane *et al.*, 2015). Esto sucede en todas las células, cuando se exponen a diversos tipos de NPs. En un estudio reciente, en el que se expusieron mitocondrias de una línea celular neuronal humana a 2.6×10^{10} NPs de sílice durante 24h, el consumo de O_2 se redujo un 36.8% (Ducray *et al.*, 2017), un porcentaje muy similar a lo que se encontró en este trabajo, el cual fue de 36.28% a los 90 minutos de exposición en la primera adición de ADP, sin embargo en la segunda adición de ADP el

consumo de O_2 se redujo un 40.28% siendo mayor que lo reportado por Ducray *et al.*, 2017. Asimismo células madre neuronales humanas se expusieron a 1 mg/ml de partículas de sílice durante 7 días y su respiración mitocondrial disminuyó hasta un 74.5% (Fujioka *et al.*, 2014), siendo este un porcentaje mayor a lo encontrado en este trabajo. Por lo que se podría sugerir que la actividad respiratoria irá cambiando respecto a su control cuando se exponen mitocondrias de cerebro de rata a partículas de E171 a un mayor tiempo de exposición.

En la relación P:O se encontró una disminución especialmente a los 45 y 90 min de exposición a E171 como consecuencia de la reducción en el consumo de oxígeno. Sin embargo, la repolarización (tiempo requerido para completar el consumo de ADP agregado) incrementó a comparación del control, lo que indica una mayor cantidad de oxígeno consumido en mitocondrias tratadas con E171 cuando se añadió ADP.

Además, es necesario apreciar que los valores en estado 3 y CR disminuyeron en las mitocondrias expuestas a E171 cuando se les adicionó 0.36mM de ADP (el doble de la concentración inicial) a comparación con el control en todos los tiempos de exposición. Asimismo cabe mencionar que, el estado 4 se obtiene en ausencia de ADP por lo tanto, un aumento en el valor del estado 4 indicaría que hay más mitocondrias desacopladas en comparación con el control y en presencia de algún sustrato como malato/piruvato. Esto, solo se encontró en la segunda adición de ADP a los 45 min de exposición a partículas de E171 (Figura 13).

Por otra parte Nalika y Parvez en el 2015 mostraron que la actividad respiratoria de mitocondrias aisladas de cerebro de rata disminuyó los niveles del complejo I: NADH deshidrogenasa, del complejo II: succinato deshidrogenasa y la ATP sintasa, cuando se expusieron a NPs de TiO_2 esféricas a concentraciones de 5, 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 hora. En este trabajo se ocupó una concentración de 1 mg/ml de E171, por lo cual se podría suponer que a concentraciones más altas de E171 ocurran cambios en la actividad respiratoria mitocondrial, similares a los reportados anteriormente con las NPs de TiO_2 esféricas.

Por otro lado, si las partículas de E171 llegarán a las mitocondrias neuronales, podrían generar enfermedades neurológicas, como por ejemplo: la enfermedad de Parkinson (PD, por sus siglas en inglés), en la cual, se reduce la actividad del complejo I mitocondrial (Schapira *et al.*, 1989). La PD se caracteriza por una serie de trastornos motores y no motores así como la pérdida de neuronas dopaminérgicas dentro de la sustancia nigra pars compacta (Devasena y Francis 2015), y precisamente una función primordial de las mitocondrias en las neuronas dopaminérgicas es generar ATP (Langston *et al.*, 1983), contribuyendo con la transmisión de los neurotransmisores desde una neurona pre-sináptica a una post-sináptica (Kang *et al.*, 2016) y manteniendo la funcionalidad del citoesqueleto. Algunos estudios indican que las NPs pueden inhibir la migración celular a través de daños al citoesqueleto (Hou *et al.*, 2013; Tay *et al.*, 2014). Asimismo, la exposición a E171 podría afectar las uniones estrechas entre las células endoteliales, provocando así que cambie la permeabilidad de la BHE (Kang *et al.*, 2016), además de ocasionar, cambios morfológicos en la estructura y funciones del cerebro.

En las neuronas, la mayor cantidad de mitocondrias se encuentran justo en los axones y los botones axónicos encargados de transmitir la información sináptica de una neurona a otra. Esta función es relevante para funciones como la sinapsis tanto química, como la eléctrica. En la primera, para transmitir el impulso eléctrico dado por el potencial de acción creado por la bomba de Na^+/K^+ y en la segunda para liberar neurotransmisores como por ejemplo acetilcolina, dopamina, serotonina, GABA y noradrenalina, entre otros. Estos transmisores activan receptores en las neuronas post-sinápticas que resultan en la excitabilidad neuronal, la transmisión sináptica, y el funcionamiento de la red neuronal (Newman, 2003; Volterra y Meldolesi, 2005; Araque, 2008; Navarrete *et al.*, 2013; Araque *et al.*, 2014).

Independientemente de si las partículas atraviesan o no la BHE, en este trabajo se decidió averiguar cuáles serían los efectos sobre la mitocondria si las E171 logran atravesar la BHE. Si estas partículas logran atravesar la BHE se acumularían en el transcurso de la vida, aumentando el riesgo de padecer enfermedades neurológicas.

7.3. Cambios morfológicos de las mitocondrias

La morfometría de las mitocondrias no cambia durante los primeros 60 min de exposición a E171, sin embargo hay un aumento progresivo en el área que ocupa la membrana mitocondrial y la pérdida entre el espacio de las crestas es evidente cuando llegan a los 90 min de incubación donde se ve el aumento del área mitocondrial a los 45 min de exposición. Además, este hecho es similar a lo que previamente reportaron Jain *et al.*, 2017, quienes demostraron que cuando se exponen células de fibroblastos de pulmón a 25 mg/ml NPs de TiO₂ esféricas (anatasa) durante 24h, existe una pérdida entre el espacio de las crestas mitocondriales, lo que podría indicar que a mayor tiempo de exposición a partículas de E171 pueda ocurrir pérdida de crestas, sin embargo en este trabajo se demostró que durante los 90 min de exposición no se observa una aparente pérdida de crestas. Algo similar reportaron Natarajan *et al.*, en 2015 pero en hígado ya que allí es el sitio de acumulación para muchas NPs, ellos mostraron que la morfología de las mitocondrias se modifica a tal grado que se fragmentan. Esto se realizó en hepatocitos expuestos a 50 ppm de NPs de TiO₂ esféricas durante 72 h. Esto podría indicar que una concentración más alta y un mayor tiempo de exposición de las mitocondrias a E171, como sería durante el transcurso de la vida, podrían tener efectos más evidentes sobre la estructura mitocondrial del cerebro y causar daños irreversibles en la salud de las personas.

Recientemente, se ha demostrado que mitocondrias de células gliales de rata y de humano cambian su forma cuando son tratadas con 1 mg/ml de NPs de TiO₂ esféricas por 24 y 48h, además de que aumentan su potencial de membrana (Huerta-García *et al.*, 2014). Esta es una evidencia más sobre el daño que podrían ocasionar las partículas de E171 si llegarán al cerebro. Además se ha reportado que existen cambios morfológicos en mitocondrias de tejido cerebral cuando son expuestos por vía inhalatoria a NPs de TiO₂ (0.1, 1 y 10 mg/kg) por 72 h, se menciona que las mitocondrias sufren de hinchazón (Liu *et al.*, 2013). Algo muy parecido a lo reportado en este trabajo cuando las mitocondrias se expusieron a E171 por 45 minutos su área aumentó, podría pensarse que a más tiempo de exposición continuará este aumento. Sin embargo, esto no ocurrió.

Por el contrario no hubo diferencias significativas en el área, pero sí disminuyó la cantidad de mitocondrias por campo a los 90 min (Figura 15).

En 2015 Wilson y colaboradores, reportaron que la presencia de NPs de TiO₂ esféricas en los astrocitos indujo cambios morfológicos y cambios en la dinámica de la mitocondria. Se observó que bajas concentraciones de TiO₂ esféricas provocaron que las mitocondrias aumentarán su área mitocondrial, mientras que altas concentraciones provocaron su fragmentación. Además, Wu y colaboradores reportaron la pérdida en el potencial de membrana mitocondrial en la línea celular PC12 expuestas a NPs de TiO₂ (Wu *et al.*, 2010).

A pesar de que las concentraciones de NPs que se pueden alcanzar en diferentes órganos humanos pueden llegar a ser menores que las concentraciones usadas en ensayos *in vitro*. Es probable que en diferentes exposiciones y consumo de productos que contengan NPs de TiO₂, se pueda alcanzar una concentración alta equivalente a la empleada en ensayos *in vitro* dada por la acumulación de las NPs (Huerta-García *et al.*, 2015). Por ello, es necesario averiguar si las E171 son capaces de atravesar la BHE y continuar el estudio de sus efectos en la salud.

7.4. Ubicación de partículas E171 en cerebro de rata

En el presente trabajo, en ratas sin tratamiento se observaron algunos cuerpos densos con forma de aglomerados que miden entre 37 y 351 nm en los controles. Estos cuerpos densos (oscuras) son normales en el tejido cerebral y pueden estar hechos de actina, miosina o desmina, así como zonas sinápticas y mielina, entre otras (Zagon y Haring 1982). Sin embargo en la corteza del cerebro de rata tratada con E171 (flecha verde, Figura 16) se encontraron otras zonas densas que podrían ser aglomerados de E171 con tamaños mayores a los encontrados en los controles, y semejantes en tamaño a los de los aglomerados suspendidos en solución salina y suero de rata los están rompiendo una mitocondria (Figura 16).

Se podría sugerir, por lo anterior, que a las 24h de exposición las partículas de E171 estarían atravesando la BHE. Sería recomendable utilizar un marcador específico de E171 con el que se pudiera seguir la ruta del mismo y/o hacer un análisis con un espectroscopio de energía dispersa de rayos X (EDS por sus siglas en inglés) que pueda confirmar la presencia de titanio en las zonas sospechosas directamente en el corte de la corteza.

El hecho de que las E171 se acumulen en el hemisferio derecho conlleva a diferentes afectaciones, por ejemplo, las percepciones espaciales cuantitativas, la comprensión musical, el reconocimiento de categorías de personas y de objetos (Rotta *et al.*, 2007). Se ha demostrado que cada hemisferio controla funciones del cuerpo contrarias (Society for Neuroscience, 2008). Una lesión mayor que se produce en el hemisferio derecho es la hemiparesia izquierda, la cual se caracteriza por la disminución de la fuerza motora o parálisis parcial que puede afectar un brazo y una pierna del mismo lado del cuerpo, y es consecuencia de la falta de O₂ en el cerebro (Ross y Mesulam, 1979).

Las zonas cerebrales que pueden ser afectadas/comprometidas por la exposición a las partículas de E171 son el hipocampo, tálamo y la corteza, entre otras. Se ha demostrado que en ratones que han sido expuestos por vía intravenosa a NPs de TiO₂ esféricas (1387 mg/k), presentaron ciertas lesiones en el cerebro, en especial en células neuronales en el hipocampo, siendo un indicativo de degeneración (Xu *et al.*, 2013). El hipocampo está relacionado con la memoria, el aprendizaje y la emoción (Society for Neuroscience, 2008), por lo que alguna afectación en esta zona podría dar lugar a la enfermedad de Alzheimer, caracterizada entre otras cosas por la muerte de neuronas en el hipocampo y corteza cerebral (Weimer *et al.*, 2009). Por otro lado, las funciones relacionadas al tálamo son el tacto y el dolor. El daño al tálamo también está relacionado con la etapa de crisis generalizada durante la epilepsia, la cual resulta en la pérdida de la conciencia y causa cambios conductuales incluyendo convulsiones. Durante la crisis generalizada, existe una actividad eléctrica simultánea excesiva en una amplia zona del cerebro incluyendo el tálamo y corteza (Society for Neuroscience, 2008). Por último, las funciones que regula la corteza cerebral son muy variadas, algunas son la percepción,

emoción, pensamiento, audición, lenguaje y el sueño, por mencionar algunas, y afectaciones en ella podría implicar un riesgo mayor en la salud, provocando por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (Society for Neuroscience, 2008).

En un trabajo realizado en el 2008 se demostró que por vía intranasal las NPs de TiO₂ esféricas se pueden acumular en el hipocampo y corteza de cerebro de ratón a una concentración de 500 µg/kg durante 2 días (Wang *et al.*, 2008b). Incluso se ha demostrado que a concentraciones más grandes (2.5, 5 y 10 mg/kg) se afecta la anatomía del hipocampo de ratones, provocando proliferación de células gliales, hasta posibles necrosis de neuronas y degeneración neuronal (Ze *et al.*, 2014).

7.5. Planteamiento del modelo de los efectos del E171 en mitocondrias aisladas de cerebro de rata.

En este estudio se aporta información sobre una pequeña parte de la toxicidad de las partículas de E171, que si bien no es estrictamente un NM puro, sí contiene partes nanométricas que podrían causar un daño. Se propone que la mitocondria podría descomponerse a lo largo del tiempo por la exposición a partículas de E171. Al comenzar con el tratamiento de las partículas, se observa que la forma cambia aumentando significativamente su área. Se plantea que, a partir de la membrana más externa de las mitocondrias, ésta se va debilitando por la presencia de las E171, de la misma manera en como se ha reportado que otras NPs metálicas son capaces de debilitar membranas y tejidos (Torrano *et al.*, 2016), a manera de una liga que se estira hasta su límite, y posteriormente se forman perforaciones permanentes como los que ya han sido reportados con la exposición a otras NPs (Torrano *et al.*, 2016). Si este proceso continuará, se van desprendiendo pedazos de membrana. Así persiste el proceso hasta que las mitocondrias desaparecen con el tiempo, como se observa en el número de mitocondrias a los 90 min de exposición. Aunado a esto el consumo de O₂ no se pierde por completo, ya que la respiración mitocondrial ocurre en las crestas que, si bien se van distanciando una de otra, al inicio es poco notorio y además la respiración es sustituida

por las pequeñas mitocondrias que se van formando más aparte las mitocondrias de mayor tamaño (Figura 18).

Por lo anterior este trabajo busca contribuir con la evidencia científica, para que en un futuro proporcione un panorama más amplio del daño que ocasionan las partículas de E171, y se tomen las medidas necesarias para disminuir el riesgo de presentar enfermedades neuronales a largo plazo.

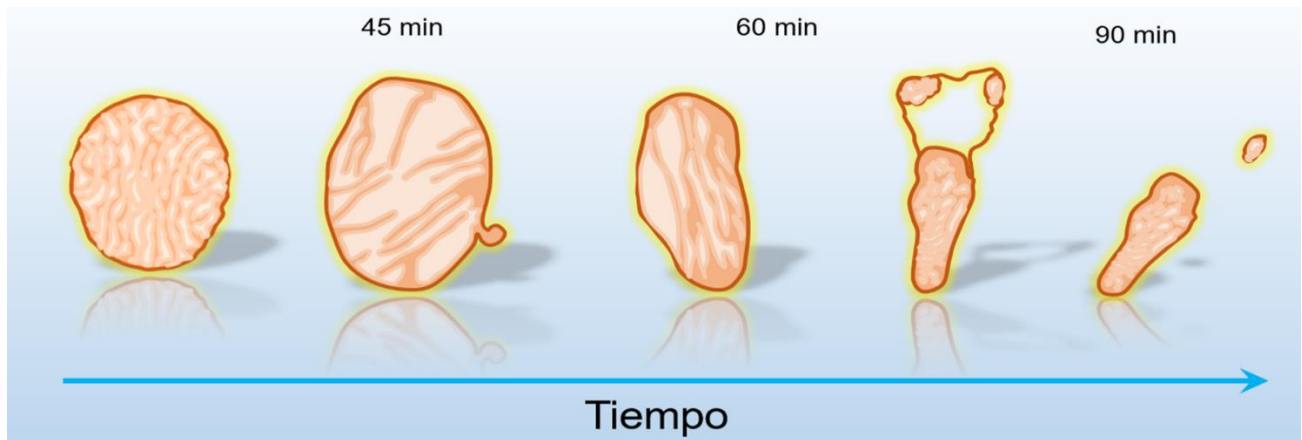


Figura 18. Posible representación en el tiempo de lo que le ocurre a las mitocondrias de cerebro de rata cuando son expuestas a partículas de E171 (1mg/ml) e incubadas durante 45, 60 y 90 min. Las imágenes fueron tomadas y levemente modificadas a partir de las microscopias por TEM a los diferentes tiempos. Figura realizada por Aguilar Olivares Kevin Jair y Lomeli Castillo Jocelyn Lucero.

CONCLUSIONES

8. Conclusiones

- 1) Las partículas de E171 forman aglomerados homogéneamente suspendidas al momento de la administración lo que indica que posiblemente podrían atravesar la BHE.
- 2) Algunos parámetros de la función respiratoria tales como CR, y P:O, fueron afectados especialmente a los 45 y 90 min de exposición a partículas de E171 (1mg/ml), disminuyendo significativamente, a comparación del respectivo control en las dos adiciones de ADP, sin embargo la repolarización aumentó a los 45 y 90 min de exposición. Además, los valores de la relación con una doble adición de ADP disminuyeron el CR y estado 3 cuando se expusieron mitocondrias a partículas de E171 incluso hasta los 90 min.
- 3) El área mitocondrial y el número de mitocondrias decreció considerablemente a los 90 min de exposición a partículas de E171 y se observa una aparente distancia entre las crestas desde los 45 min de exposición.
- 4) Se encontraron posibles aglomerados de partículas de E171 en corteza de cerebro de rata, sin embargo se sugieren hacer más estudios para verificar este hallazgo.

REFERENCIAS

9. Referencias

- Abbott, N., J., Patabendige, A., A., K., Dolman, D., E., M., Yusof, S., R., & Begley, D., J. 2010. *Structure and function of the blood-brain barrier*. *Neurobiology of disease*; 37 (1), 13-25.
- Araque, A. 2008. *Astrocytes process synaptic information*. *Neuron Glia Biology*; 4 (01), 3-10.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P., G., Oliet, S., H., Robitaille, R., & Volterra, A. 2014. *Gliotransmitters travel in time and space*. *Neuron*; 81 (4), 728-739.
- Bachler, G., von Goetz, N., & Hungerbühler, K., 2015. *Using physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling for dietary risk assessment of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles*. *Nanotoxicology*; 9 (3), 373-380
- Basavaraj, K., H. 2012. *Nanotechnology in Medicine and Relevance to Dermatology: Presents concepts*. *Indian Journal of Dermatology*; 57 (3), 169-174.
- Batley, G., E., Kirby, J., K., & McLaughlin, M., J. 2012. *Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments*. *Accounts of Chemical Research*, 46 (3), 854-862.
- Beal, M. F. 2005. *Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration*. *Annals of Neurology*; 58 (4), 495-505.
- Bettini, S., Boutet-Robinet, E., Cartier, C., Coméra, C., Gaultier, E., Dupuy, J., Naud, N., Taché, S., Grysan, P., Reguer, S., Thieriet, N., Réfrégiers, M., Thiaudière, D., Cravedi, J., Carrière, M., Audinot, J., Pierre, F., Guzylack-Piriou, L., & Houdeau, E. 2017. *Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon*. *Scientific Reports*; 7 (40373), 13.
- Böckmann, J., Lahl, H., Eckert, T., & Unterhalt, B. 2000. *Titan-Blutspiegel vor und nach Belastungsversuchen mit Titandioxid*. *Pharmazie*; 55 (2), 140-143.
- Bruno, M. E., Tasat, D. R., Ramos, E., Paparella, M. L., Evelson, P., Rebagliati, R. J., Cabrini, R. L., Guglielmonetti, M. B., & Olmedo, D. G. 2014. *Impact through time of different sized titanium dioxide particles on biochemical and histopathological*

- parameters*. Journal of Biomedical Materials Research Part A; 102 (5), 1439-1448.
- Bulcke, F., Thiel, K., & Dringen R. 2014. *Uptake and toxicity of copper oxide nanoparticles in cultured primary brain astrocytes*. Nanotoxicology; 8(7), 775-85.
- Canosa, E. F., Castiñeyra, I., B., Romero Magdalena, C., S., & Yáñez Conde, E. 2011. *Bioquímica: conceptos esenciales*. 1ª ed. Ed Médica Panamericana. Madrid
- Chaturvedi, R. K., & Beal, M. F. 2013. *Mitochondrial diseases of the brain*. Free Radical Biology and Medicine; 63, 1-29.
- Chibber, S., & Ahmad, I. 2016. *Molecular docking, a tool to determine interaction of CuO and TiO₂ nanoparticles with human serum albumin*. Biochemistry and Biophysics Reports; 6, 63-67.
- Cho, W. S., Kang, B. C., Lee, J. K., Jeong, J., Che, J. H., & Seok, S. H. 2013. *Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration*. Particle and Fibre Toxicology; 10 (1), 9.
- Coccini, T., Grandi, S., Lonati, D., Locatelli, C., & De Simone, U., 2015. *Comparative cellular toxicity of titanium dioxide nanoparticles on human astrocyte and neuronal cells after acute and prolonged exposure*. Neurotoxicology; 48, 77– 89.
- Codex Alimentarius, Normas Internacionales de los Alimentos. 2015. *Nombres Genéricos y Sistema Internacional de Numeración de Aditivos Alimentarios*. CAC/GLC, 36-1989.
- Comisión Europea. 2012. *Segunda revisión de la normativa sobre los nanomateriales*. <http://ec.europa.eu/transparency/regdoc/rep/1/2012/ES/1-2012-572-ES-F1-1.Pdf>. Consultado el 18/07/16
- Cupaioli, F., A., Zucca, F., A., Boraschi, D., & Zecca, L. 2014. *Engineered nanoparticles. How brain friendly is this new guest?* Progress in Neurobiology; 119-120, 20-38.
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., & Barres, B. A. 2010. *Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis*. Nature; 468 (7323), 562-566.

- Devasena, T., & Francis, A., P. 2015. *Nanotoxicity-induced Alzheimer disease and Parkinsonism: not further than diagnosis*. Journal Alzheimers Disease & Parkinsonism; 5 (178), 2161-0460.
- Disdier, C., Devoy, J., Cosnefroy, A., Chalansonnet, M., Herlin-Boime, N., Brun, E., Lund, A., & Mabondzo, A. 2015. *Tissue biodistribution of intravenously administrated titanium dioxide nanoparticles revealed blood-brain barrier clearance and brain inflammation in rat*. Particle and Fibre Toxicology; 12 (1), 27.
- Djurisic, A., B., Leung, Y. H., Ng, A., M., C., Xu, X., Y., Lee, P., K., H., Degger, N., & Wu, R., S., S. 2015. *Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts*. Small; 11(1), 26-44.
- Domínguez, A., Álvarez, A., Suárez-Merino, B., & Goñi-de-Cerio, F. 2014. *Afecciones neurológicas y barrera hematoencefálica. Limitaciones y estrategias para la liberación de fármacos al cerebro*. Revista de Neurología; 58 (5), 213-224.
- Ducray, A. D., Felser, A., Zielinski, J., Bittner, A., Bürgi, J. V., Nuoffer, J. M., Frenz, M., & Mevissen, M. 2017. *Effects of silica nanoparticle exposure on mitochondrial function during neuronal differentiation*. Journal of Nanobiotechnology; 15 (1), 49.
- EFSA. 2005. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on Titanium dioxide. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/163>. Consultado el 16/08/16.
- EFSA. 2016. *Scientific Opinion on the re-evaluation of titanium dioxide (E171) as a food additive*; 14 (9), 83. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4545>. Consultado el 24/10/16.
- EFSA. 2017. <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/food-additives>. Consultado el 20/10/17.
- EPA. 2009. *External Review Draft-Nanomaterial Case Studies: Nanoscale Titanium Dioxide in Water Treatment and in Topical Sunscreen*; 222. https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?dirEntryID=210206. Consultado el 18/09/16.
- Fariss M., W., Chan C., B., Patel M., Van Houten, B., & Orrenius, S. 2005. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. Molecular interventions; 5 (2), 94.

- Faust, J., J., Doudrick, K., Yang., Y., Capco, D., G., & Westerhoff, P. 2016. *A Facile Method for Separating and Enriching Nano and Submicron Particles from Titanium Dioxide Found in Food and Pharmaceutical Products*; *PloS one*, 11 (10), 15.
- FDA. 2017. *Titanium Dioxide. Food and Drug Administration. Department Of Health And Human Services. Subchapter A-General. Code of Federal Regulations. Title 21, Vol1.*
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=73.575>. Consultado el 13/01/17.
- Filosto, M., Scarpelli, M., Cotelli, M. S., Vielmi, V., Todeschini, A., Gregorelli, V., Tonin, P., Tomelleri, G., & Padovani, A. 2011. *The role of mitochondria in neurodegenerative diseases*. *Journal of neurology*; 258 (10), 1763-1774.
- Freyre-Fonseca, V., Delgado-Buenrostro, N., L., Gutiérrez-Cirlos, E., B., Calderón-Torres, C., M., Cabellos-Avelar, T., Sánchez-Pérez, Y., Pinzón E., Torres, I., Molina-Jijón, E., Zazueta, C., Pedraza-Chaverri, J., Garcia-Cuellar, C., M., & Chirino, Y., I. 2011. *Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function*. *Toxicology Letters*; 202 (2), 111-119.
- Fröhlich, E. 2012. *The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles*. *International journal of nanomedicine*; 7, 15.
- Fujioka, K., Hanada, S., Inoue, Y., Sato, K., Hirakuri, K., Shiraishi, K., Kanaya, F., Ikeda, K., Usui, R., Yamamoto, K., Kim, S. U., & Manome, Y. 2014. *Effects of silica and titanium oxide particles on a human neural stem cell line: morphology, mitochondrial activity, and gene expression of differentiation markers*. *International Journal of Molecular Sciences*; 15 (7), 11742-11759.
- Garduño-Balderas, L., G., Urrutia-Ortega, I., M., Medina-Reyes, E., I., & Chirino, Y. I. 2015. *Difficulties in establishing regulations for engineered nanomaterials and considerations for policy makers: avoiding an unbalance between benefits and risks*. *Journal of Applied Toxicology*; 35 (10), 13.
- George, S., Lin, S., Ji, Z., Thomas, C., R., Li, L., Mecklenburg, M., Meng, H., Wang, X., Zhang, H., Xia, T., Hohman, J., N., Lin, S., Zink, J., I., Weiss, P., S., & Nel, A., E. 2012. *Surface Defects on Plate-Shaped Silver Nanoparticles Contribute to Its*

Hazard Potential in a Fish Gill Cell Line and Zebrafish Embryos. ACS Nano; 6 (5), 3745 - 3759.

- Geraets, L., Oomen, A. G., Krystek, P., Jacobsen, N. R., Wallin, H., Laurentie, M., Verharen, H. W., Brandon, E. F., & De Jong, W. H. 2014. *Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats.* Particle and Fibre Toxicology; 11 (1), 30.
- Gerloff, K., Albrecht, C., Boots, A. W., Förster, I., & Schins, R., P. 2009. *Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells.* Nanotoxicology; 3 (4), 355 - 364.
- Glick, B. S., & Pon, L. A. 1995. [14] *Isolation of highly purified mitochondria from Saccharomyces cerevisiae.* Methods in Enzymology; 260, 213-223.
- Golpich, M., Amini, E., Hemmati, F., Ibrahim, N. M., Rahmani, B., Mohamed, Z., Rahmani, B., Mohamed, Z., Ali Raymond, A., Dargahi, L., Ghasemi, R., & Ahmadiani, A. 2015. *Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) signaling: Implications for Parkinson's disease.* Pharmacological Research; 97, 16-26.
- Golpich, M., Amini, E., Mohamed, Z., Azman Ali, R., Mohamed Ibrahim, N., & Ahmadiani, A. 2017. *Mitochondrial dysfunction and biogenesis in neurodegenerative diseases: pathogenesis and treatment.* CNS neuroscience & therapeutics; 23 (1), 5-22.
- Grissa, I., Guezguez, S., Ezzi, L., Chakroun, S., Sallem, A., Kerkeni, E., Elqhoul, J., El Mir, L., Mehdi, M., Cheikh H., B., & Haouas, Z. 2016. *The effect of titanium dioxide nanoparticles on neuroinflammation response in rat brain.* Environmental Science and Pollution Research; 23 (20), 20205-20213.
- Hartig, S., M., Greene, R., R., Dikov, M., M., Prokop, A., & Davidson, J., M. 2007. *Multifunctional nanoparticulate polyelectrolyte complexes.* Pharmaceutical research; 24 (12), 2353-2369.
- Hiona, A., Sanz, A., Kujoth, G. C., Pamplona, R., Seo, A. Y., Hofer, T., Someya, S., Miyakawa, T., Nakayama, C., Samhan-Arias, A., K., Servais, S., Barger, J., L., Portero-Otín, M., Tanokura, M., Prolla T., A., & Leeuwenburgh, C. 2010. *Mitochondrial DNA mutations induce mitochondrial dysfunction, apoptosis and*

- sarcopenia in skeletal muscle of mitochondrial DNA mutator mice*. PloS one; 5 (7), 19.
- Hou, Y., Cai, K., Li, J., Chen, X., Lai, M., Hu, Y., Luo, Z., Ding, X., & Xu, D. 2013. *Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells*. International journal of nanomedicine; 8, 3619- 3630.
- Huerta-García, E., Márquez-Ramírez, S. G., Ramos-Godinez, M. del P., López-Saavedra, A., Herrera, L. A., Parra, A., Alfaro-Moreno, E., Gomez, E., O., & López-Marure, R. 2015. *Internalization of titanium dioxide nanoparticles by glial cells is given at short times and is mainly mediated by actin reorganization-dependent endocytosis*. NeuroToxicology; 51, 27-37.
- Huerta-García, E., Pérez-Arizti, J. A., Márquez-Ramírez, S. G., Delgado-Buenrostro, N. L., Chirino, Y. I., Iglesias, G. G., & López-Marure, R. 2014. *Titanium dioxide nanoparticles induce strong oxidative stress and mitochondrial damage in glial cells*. Free Radical Biology and Medicine; 73, 84-94.
- IARC. 2010. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 93. Carbon black, titanium dioxide and talc*; 193-215. <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol93/mono93.pdf>. Consultado el 14/10/16
- ICIS. Titanium Dioxide Uses and Market. 2017. <https://www.icis.com/resources/news/2007/11/07/9076546/titanium-dioxide-tio2-uses-and-market-data/>. Consultado el 20/01/17
- Jain, A., K., Senapati, V., A., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R., & Pandey, A., K. 2017. *Impact of anatase titanium dioxide nanoparticles on mutagenic and genotoxic response in Chinese hamster lung fibroblast cells (V-79): The role of cellular uptake*. Food and Chemical Toxicology; 105, 127-139.
- Jani, P., U., McCarthy, D., E., & Florence, A., T. 1994. *Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration*. International journal of pharmaceutics; 105 (2), 157-168.
- Jiménez, L. F., & Merchant, H. 2003. *Biología celular y molecular*. 1ª ed. Pearson Educación. México

- Jovanović, B. 2015. *Critical review of public health regulations of titanium dioxide, a human food additive*. Integrated environmental assessment and management; 11 (1), 10-20.
- Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Kaiserling, E., Xiao, J. X., & Kissel, T. 2000. *Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake?*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics; 50 (1), 147-160.
- Kahru, A., & Dubourguier, H., C. 2010. *From ecotoxicology to nanoecotoxicology*. Toxicology; 269 (2-3), 105-119.
- Kang, Y., Liu, J., Song, B., Feng, X., Ou, L., Wei, L., Lai, X., & Shao, L. 2016. *Potential Links between Cytoskeletal Disturbances and Electroneurophysiological Dysfunctions Induced in the Central Nervous System by Inorganic Nanoparticles*. Cellular Physiology and Biochemistry; 40 (6), 1487-1505.
- Karp, G. 2009. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. 5ª ed. McGraw Hill. México.
- Khalaj, M., J., Ahmadi, H., Lesankhosh, R., & Khalaj, G. 2016. *Study of physical and mechanical properties of polypropylene nanocomposites for food packaging application: Nano-clay modified with iron nanoparticles*. Trends in Food Science & Technology; 51, 41-48.
- Kilbride, S. M., Gluchowska, S. A., Telford, J. E., O'Sullivan, C., & Davey, G. P. 2011. *High-level inhibition of mitochondrial complexes III and IV is required to increase glutamate release from the nerve terminal*. Molecular neurodegeneration; 6 (1), 53.
- Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Kroll, A., Hahn, D., Schnekenburger, J., Wiench, K., & Wohlleben, W. 2010. *Testing Metal-Oxide Nanomaterials for Human Safety*. Advanced Materials; 22 (24), 2601– 2627.
- Langston, J., W., Ballard, P., Tetrad, J., W., & Irwin, I. 1983. *Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis*. Science; 219 (4587), 979–980.
- Lin, M., T., & Beal, M., F. 2006. *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Nature: 443 (7113), 787-795.

- Liu, X., Sui, B., & Sun, J. 2017. *Blood-brain barrier dysfunction induced by silica NPs in vitro and in vivo: Involvement of oxidative stress and Rho-kinase/JNK signaling pathways*. *Biomaterials*; 121, 64-82.
- Liu, Y., Xu, Z., & Li, X. 2013. *Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in rat neuroglia cells*. *Brain Injury*; 27 (7-8), 934-939.
- Luyts, K., Napierska, D., Nemery, B., & Hoet, P. H. 2013. *How physico-chemical characteristics of nanoparticles cause their toxicity: complex and unresolved interrelations*. *Environmental Science: Processes & Impacts*; 15 (1), 23-38.
- Ma, H., Williams, P., L., & Diamond, S., A. 2013. *Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles—a review*. *Environmental Pollution*; 172, 76-85.
- Mattei T., A., & Rehman A., A. 2015. *"Extremely minimally invasive": recent advances in nanotechnology research and future applications in neurosurgery*. *Neurosurgical review*; 38 (1), 27-37.
- McFarland, R., Taylor, R., W., & Turnbull, D. M. 2010. *A neurological perspective on mitochondrial disease*. *The Lancet Neurology*; 9 (8), 829-840.
- Milane, L., Trivedi, M., Singh, A., Talekar, M., & Amiji, M. 2015. *Mitochondrial biology, targets, and drug delivery*. *Journal of Controlled Release*: 207, 40-58.
- Nalika, N., & Parvez, S. 2015. *Mitochondrial dysfunction in titanium dioxide nanoparticle-induced neurotoxicity*. *Toxicology Mechanisms and Methods*; 25 (5), 355-363.
- Natarajan, V., Wilson, C. L., Hayward, S. L., & Kidambi, S. 2015. *Titanium dioxide nanoparticles trigger loss of function and perturbation of mitochondrial dynamics in primary hepatocytes*. *PLoS One*; 10 (8), e0134541.
- Navarrete, M., Perea, G., Maglio, L., Pastor, J., García de Sola, R., & Araque, A. 2013. *Astrocyte calcium signal and gliotransmission in human brain tissue*. *Cerebral Cortex*; 23 (5), 1240-1246.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. 2009. *Lehninger principios de bioquímica*. 5ª ed. Ediciones Omega. Barcelona.
- Neustadt, J., & Pieczenik, S. R. 2008. *Medication-induced mitochondrial damage and disease*. *Molecular nutrition & food research*; 52 (7), 780-788.
- Newman, E. A. 2003. *New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission*. *Trends in neurosciences*; 26 (10), 536-542.

- NIOSH. 2011. *Current intelligence bulletin 63. Occupational Exposure to Titanium Dioxide*; 140. <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2011-160/pdfs/2011-160.pdf>. Consultado el 15/08/16.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Nowack, B., & Bucheli, T., D. 2007. *Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment*. *Environmental pollution*; 150 (1), 5-22.
- Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D., & Yang, H. 2005. *Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy*. *Particle and fibre toxicology*; 2 (1), 8.
- Onyango, I. G., Lu, J., Rodova, M., Lezi, E., Crafter, A. B., & Swerdlow, R. H. 2010. *Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*; 1802 (1), 228-234.
- Oropesa-Nuñez, R., & Jáuregui-Haza, U., J. 2012. *Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas Nanoparticles as drug carriers: characteristics and perspectives*. *CENIC Ciencias Biológicas*; 43(3), 20.
- Pal, S., Tak, Y., K., & Song, J., M. 2007. *Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*; 73 (6), 1712-1720.

- Pardridge W., M. 2007. *Blood-brain barrier delivery*. Drug Discovery Today; 12 (1), 54-61.
- Pardridge, W., M. 1981. *Transport of nutrients and hormones through the blood-brain barrier*. Diabetologia; 20 (3), 246-254.
- Parlamento Europeo. 1994. European parliament, council directive on colours for use in foodstuffs; 94/36/EC. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX%3A31994L0036>. Consultado el 08/12/16.
- Peters, R. J., Bouwmeester, H., Gottardo, S., Amenta, V., Arena, M., Brandhoff, P., Marvin, H., J., P., Mech, A., Moniz, F., B., Pesudo, L., Q., Rauscher, H., Schoonjans, R., Undas, A., K., Vettori, M., V., Weigel, S., & Aschberger, K. 2016. *Nanomaterials for products and application in agriculture, feed and food*. Trends in Food Science & Technology; 54, 155-164.
- Peters, R., J., B., van Bommel, G., Herrera-Rivera, Z., Helsper, J., P., F., G., Marvin, H., J., P., Weigel, S., Tromp, P., Oomen, A., G., Rietveld, A., & Bouwmeester, H. 2014. *Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles*. Journal of Agricultural and Food Chemistry; 62 (27), 6285-6293.
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., & Nowack, B. 2012. *Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world*. Journal of Nanoparticle Research; 14 (9), 11.
- Reichel, A. 2009. Addressing central nervous system penetration in drug discovery: basics and implications of the evolving new concept. Chemistry & biodiversity; 6 (11), 2030-2049.
- Ross, E. D., & Mesulam, M. M. 1979. *Dominant language functions of the right hemisphere?: Prosody and emotional gesturing*. Archives of neurology; 36 (3), 144-148.
- Rotta, N., Ranzan, J., Ohlweiler, L., Soncini Kapzink, N., & Steiner, S. 2007. *Síndromes del hemisferio no dominante*. Medicina (Buenos Aires); 67 (6), 593-600.
- Sadeghi, B., Garmaroudi, F., S., Hashemi, M., Nezhad, H., R., Nasrollahi, A., Ardalan, S., & Ardalan, S. 2012. *Comparison of the anti-bacterial activity on the nanosilver*

- shapes: nanoparticles, nanorods and nanoplates*. *Advanced Powder Technology*; 23 (1), 22-26.
- Schapira, A., H., V., Cooper, J., M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J., B., & Marsden, C., D. 1989. *Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease*. *The Lancet*; 333 (8649), 1269.
- Sharifi, S., Behzadi, S., Laurent, S., Forrest, M., L., Stroeve, P., & Mahmoudi, M. 2012. *Toxicity of nanomaterials*. *Chemical Society Reviews*; 41 (6), 2323-2343.
- Sharma, J., Johnston, M. V., & Hossain, M. A. 2014. *Sex differences in mitochondrial biogenesis determine neuronal death and survival in response to oxygen glucose deprivation and reoxygenation*. *BMC neuroscience*; 15 (1), 1-14.
- Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., & Zhao, J., 2013. *Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data*. *Particle and fibre toxicology*; 10 (1), 15.
- Shinohara, N., Danno, N., Ichinose, T., Sasaki, T., Fukui, H., Honda, K., & Gamo, M. 2014. *Tissue distribution and clearance of intravenously administered titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles*. *Nanotoxicology*; 8 (2): 132-141.
- Sims, N. R., & Anderson, M. F. 2008. *Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation*. *Nature protocols*; 3 (7), 1228-1239.
- Skalska, J., Frontczak-Baniewicz, M., & Struzynska, L. 2015. *Synaptic degeneration in rat brain after prolonged oral exposure to silver nanoparticles*. *Neurotoxicology*; 46, 145-54.
- Skocaj, M., Filipic, M., Petkovic, J., & Novak, S. 2011. *Titanium dioxide in our everyday life; is it safe?*. *Radiology and oncology*; 45(4), 227-247.
- Society for Neuroscience. 2008. *Brain Facts. Apuntes sobre el cerebro y el sistema nervioso*. *Revista de Neurobiología por Universidad Veracruzana*; 76.
- Tay, C., Y., Cai, P., Setyawati, M., I., Fang, W., Tan, L., P., Hong, C., H., Chen, X., & Leong, D., T. 2014. *Nanoparticles strengthen intracellular tension and retard cellular migration*. *Nano Letters*; 14 (1), 83-88.
- Torrano, A. A., Herrmann, R., Strobel, C., Rennhak, M., Engelke, H., Reller, A., Hilger, I., Wixforth, A., & Bräuchle, C. 2016. *Cell membrane penetration and mitochondrial targeting by platinum-decorated ceria nanoparticles*. *Nanoscale*; 8 (27), 13352-13367.

- Trushina, E., & McMurray, C. T. 2007. *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases*. Neuroscience; 145 (4), 1233-1248.
- Urrutia-Ortega, I., M, Garduño-Balderas, L., G., Delgado-Buenrostro, N., L., Freyre-Fonseca, V., Flores-Flores, J., O., Gonzales-Robles, A., Pedraza-Chaverry, J., Hernandez-Pando, R., Rodriguez-Sosa, M., Leon-Cabrera, S., Terrazas, L., I., Van Loveren, H., & Chirino, Y., I. 2016. *Food-grade titanium dioxide exposure exacerbates tumor formation in colitis associated cancer model*. Food and
- Verdin, E., Hirschey, M., D., Finley, L. W., & Haigis, M. C. 2010. *Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling*. Trends in biochemical sciences; 35 (12), 669-675.
- Volterra, A., & Meldolesi, J. 2005. *Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues*. Nature Reviews Neuroscience; 6 (8), 626-640.
- Wang, J., Chen, C., Liu, Y., Jiao, F., Li, W., Lao, F., Li, Y., Li, B., Ge, C., Zhou, G., Gao, Y., Zhao, Y., & Chai, Z. 2008. *Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO₂ nanoparticles in the anatase and rutile cristal phases*. Toxicology Letters, 183 (1-3), 72-80
- Wang, J., Liu, Y., Jiao, F., Lao, F., Li, W., Gu, Y., Li, Y., Ge, C., Zhou, G., Li, B., Zhao, Y., Chai, Z., & Chen, C. 2008a. *Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles*. Toxicology; 254 (1), 82-90.
- Weimer, D., L., & Sager, M., A. 2009. *Early identification and treatment of Alzheimer's disease: social and fiscal outcomes*. Alzheimer's & Dementia; 5 (3), 215-226.
- Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., HristovskK, I., & Goetz von, N. 2012. *Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products*. Environmental Science and Technology; 46 (4), 2242–2250
- Wilson, C. L., Natarajan, V., Hayward, S., L., Khalimonchuk, O., & Kidambi, S. 2015. *Mitochondrial dysfunction and loss of glutamate uptake in primary astrocytes exposed to titanium dioxide nanoparticles*. Nanoscale; 7 (44), 18477-18488.
- Wu, J., Sun, J., & Xue, Y. 2010. *Involvement of JNK and P53 activation in G2/M cell cycle arrest and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in neuron cells*. Toxicology Letters; 199 (3), 269-276.

- Xu, J., Shi, H., Ruth, M., Yu, H., Lazar, L., Zou, B., Yang, C., Wu, A., & Zhao, J. 2013. *Acute toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in mice*. PloS one; 8 (8), e70618.
- Xu, T., Z., N., Nichols, H., L., Shi, D., & Wen, X. 2007. *Modification of nanostructured materials for biomedical applications*. Materials Science and Engineering C: 27(3), 579-594.
- Yang, Y., Doudrick, K., Bi, X., Hristovski, K., Herckes, P., Westerhoff, P., & Kaegi, R. 2014. *Characterization of food-grade titanium dioxide: the presence of nanosized particles*. Environmental science & technology; 48 (11), 6391-6400.
- Yao, J., Irwin, R. W., Zhao, L., Nilsen, J., Hamilton, R. T., & Brinton, R. D. 2009. *Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences; 106 (34), 14670-14675.
- Zagon, I. S., & Haring, J. H. 1982. *Protargol silver impregnation and neuronal selectivity*. Cells Tissues Organs; 114 (3), 193-210.
- Ze, Y., Sheng, L., Zhao, X., Hong, J., Ze, X., Yu, X., Pan, X., Lin, A., Zhao, Y., Zhang, C., Zhou, Q., Wang, L., & Hong, F. 2014. *TiO₂ nanoparticles induced hippocampal neuroinflammation in mice*. PloS One; 9 (3), e92230.
- Zhang, R., Bai, Y., Zhang, B., Chen, L., & Yan, B. 2012. *The potential health risk of titania nanoparticles*. Journal of Hazardous Materials; 211, 404-413.

GLOSARIO

GLOSARIO

Aditivo: cualquier sustancia permitida que, sin tener propiedades nutritivas, se incluya en la formulación de los productos y que actúe como estabilizante, conservador o modificador de sus características organolépticas, para favorecer ya sea su estabilidad, conservación, apariencia o aceptabilidad

Barrera hematoencefálica: Estructura morfológica constituida por las células del endotelio vascular pericitos, astrocitos perivascuales y la microglía, regula el intercambio entre la sangre circulante y el tejido nervioso, siendo un sistema de difusión esencial para el buen funcionamiento del sistema nervioso central

Control respiratorio: relación de la velocidad entre el estado 3 y el estado 4 (pendientes) cuando se añade ADP a la muestra mitocondrial

Corteza cerebral: Capa más externa de los hemisferios del cerebro. Es bastante responsable de todas las formas de experiencia consciente, incluyendo la percepción, emoción, planeación y pensamiento.

Estado 3: Consumo rápido de O₂ en presencia de ADP

Estado 4: Etapa en la cual el ADP ha sido agotado

Fase lag: Tiempo requerido por la mitocondria en consumir el oxígeno presente después de la adición de ADP

Hipocampo: Estructura en forma de caballito de mar localizada dentro del cerebro y considerada una parte importante del sistema límbico. Una de las áreas más estudiadas del cerebro, funciona en el aprendizaje, memoria y emoción.

Mitocondria: Organelo cilíndrico pequeño en el interior de las células que provee energía para la célula al convertir el azúcar y el oxígeno en moléculas de energía, llamadas adenosin trifosfato (ATP)

Nanomaterial: un material natural, o sintético que contenga partículas, sueltas o en agregado/ aglomerado en el que por lo menos el 50 % de las partículas miden entre 1 y 100 nm en una o más de sus dimensiones

Nanopartícula: Toda partícula que mide entre 1 y 100 nanómetros.

Partícula: Una parte muy pequeña de algo

Relación P:O: Cantidad de nanoátomos de oxígeno consumido por nanomoles de ADP añadido

Repolarización: Consumo de oxígeno registrado cuando se añade ADP a la muestra mitocondrial

Tálamo: Estructura que consiste en dos masas de tejido nervioso en forma de huevo, cada una del tamaño de una nuez, en el cerebro profundo. Es una estación clave para filtrar información.

ANEXOS

Anexo I

Extracción de mitocondrias de cerebro de rata por método A

Modificado de Sims Neil & Anderson Michelle, 2008, Nature Publishing Group.

Método realizado en Laboratorio 2. Bioquímica y Bioenergética. UBIMED, a cargo de la Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid, y la técnico M. en C. Tecilli Cabellos Avelar

1. Poner los rotores en el cuarto frío una noche antes del experimento
2. Prender las dos centrifugas y el aire acondicionado (antes de comenzar el experimento)
3. Cerrar las centrifugas cuando se prenden
4. Pesar el vaso de precipitado y tarar
5. Sin usar de nuevo la balanza, mantenerla así y poner a enfriar el vaso de precipitado
6. Poner todos los vasos a utilizar, así como la caja Petri, tubos, Potter y demás material en bandejas con hielo
7. Poner el buffer de aislamiento (b. a.) en hielo
8. Sacar el buffer de respiración del refrigerador, dejarlo a temperatura ambiente
9. Las tijeras de disección ponerlas en tubos de 15ml, y dejarlas en hielo
10. Agregarles un poco de b. a. a los tubos de 15ml para que cubran las puntas de las tijeras
11. Se sacrifica a la rata con guillotina a un lado de la tarja
12. Decapitar rápido y extraer en ≈ 1 min máximo el cerebro, con unas pinzas de alicata y tijeras
13. Pesar el cerebro en el vaso de precipitado, anteriormente pesado, registrar dato.
14. Agregarle al tejido un poco de b. a. para quitar la sangre con movimientos circulatorios. Retirar el b. a. con pipeta Pasteur.
15. Repetir procedimiento anterior
16. Agregar un último b. a.
17. Cortar con las tijeras en el buffer, el tejido en pedazos de $\approx 3\text{mm}^3$
18. Se quita el ultimo buffer agregado, cuidando de no llevarse pedazos de tejido
19. Calcular los mililitros de b. a. que se utilizaran y agregarlos al tejido

| |
|-------------------------|
| 1 g tejido – 10ml b. a. |
|-------------------------|

20. Pasar esta solución a un Potter grande
21. Homogeneizar ≈ 4 veces muy suave sobre hielo
22. Tomar alícuota de 200 μ l para evaluar proteína total (en tubo ependorf y etiquetar)
23. Pasar el homogeneizado a un tubo de centrifuga

24. En otro tubo de centrifuga agregar agua destilada
25. Balancear ambos tubos (ajustar solo el agua al homogeneizado).
26. Poner los tubos en contraposición en el rotor de centrifuga (Thermo - Sorvall legend XFR centrifuge)
27. Centrifugar a 1300g a 4°C por 3 min
28. Recuperar el sobrenadante (SN 1) con pipeta Pasteur y pasarlo a un tubo de ultracentrífuga
29. El tubo de ultracentrífuga con el SN 1 se mantiene sobre hielo
30. Lo que quedo (pellet) en el otro tubo de centrifuga, agregarle la mitad de lo que se puso primero del b. a. (paso 19)
***ejemplo si se puso 10 ml de b. a.--- ahora poner 5 ml de b. a.
31. Pasar esta solución a un potter grande y homogeneizar \approx 4 veces
32. Pasar al tubo de centrifuga antes utilizado
33. Apagar el aire acondicionado
34. Balancear tubos (agua y homogeneizado), ajustar solo el agua al homogeneizado.
35. Prender el aire acondicionado
36. Centrifugar a 1300g a 4° C por 3 min
37. Juntar SN 1 con este nuevo SN
38. Apagar aire acondicionado
39. Balancear tubos (agua y homogeneizado), ajustar solo el agua al homogeneizado.
40. Prender aire acondicionado
41. Poner los tubos en contraposición en el rotor de ultracentrífuga (Sorvall ultra Pro 80)
42. Centrifugar los SNs reunidos a 21 000g (rpm= 14060) a 4° C por 15min

Datos para ultracentrífuga (si no se tienen las rpm):

Radio rotor = 9.51

*VAC --- menú --- 2 mode ---1 rcf --- 9.51 --- speed --- (las rcf que se desean) ----enter – time (el tiempo que se desea) --- enter --- (esperar a que llegue a MED) --- start

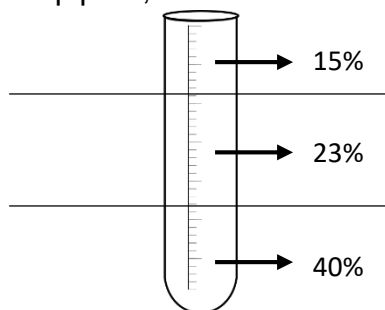
Cuando se tienen las rpm:

VAC---- speed--- (las rpm que se desean) ----enter ---- time ---- (el tiempo que se desea) ---- enter--- (esperar a que llegue a MED) ----- start

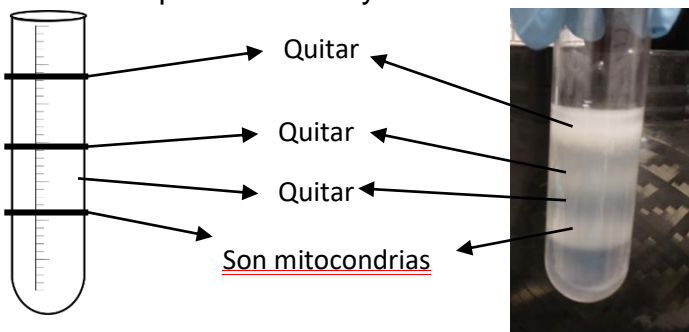
43. Preparar los gradientes de percoll y mantenerlos en frio (los cálculos ya se hicieron anteriormente)
Para 7ml de percoll y b. a.
40% —————> 2.8 ml percoll + 4.2 ml b. a.
23% —————> 1.61 ml percoll + 5.39 ml b. a.

15% ———> 1.05 ml percoll + 5.95 ml b. a.

44. Con mucho cuidado formar 2 capas, 40 y 23 % de percoll en un tubo de ultracentrífuga. Se dejarán caer por la pared del tubo desde la parte de arriba poco a poco con una micropipeta, el tubo debe estar en el frío



45. Desechar el SN con pipeta Pasteur
 46. Agregarle al pellet el 15 % de percoll y b. a.
 47. Despegar el pellet de la pared del tubo con ayuda de la micropipeta (ir recogiendo un poco de percoll y aventarla a la pared del tubo donde está el pellet, hacer esto 3 o 4 veces hasta que se despeje)
 48. Homogeneizar en potter mediano
 49. Pasar el homogeneizado al tubo de percoll con el 40 y 23% con una micropipeta con la punta cortada. Dejar caer por la pared del tubo poco a poco desde la parte de arriba
 50. Apagar aire acondicionado
 51. Balancear tubos (agua y gradiente de percoll), ajustar solo el agua al gradiente.
 52. Prender aire acondicionado
 53. Centrifugar a 30 700g (rpm= 17,000) a 4°C por 12 min
 54. Impregnar un tubo de ultracentrífuga con b. a. al cual se pasarán las mitocondrias
 55. Con pipeta Pasteur quitar banda 1 y 2



56. Con una micropipeta con la punta cortada sacar la 3° banda con cuidado de no llevarse percoll, y pasar al tubo de ultracentrífuga impregnado con b.a.
 57. Medir lo que salió de mitocondria en ml
 58. Agregar 4 volúmenes de b. a. a la fracción mitocondrial. Ejemplo: Si salieron 4ml se multiplica 4ml X4 = 16ml
 59. Al ir agregando los volúmenes se va agitando con movimientos circulares

60. Apagar aire acondicionado
61. Balancear 2 tubos (homogeneizado y agua)
62. Prender aire acondicionado
63. Centrifugar a 16 700g (rpm= 12538) a 4°C por 15 min
64. Montar oxímetro y pesar 0.01g de BSA, agregarlos en 1ml de agua destilada y vortexearlo
65. Poner los sustratos en hielo (malato, piruvato y ADP)
66. Preparar un tubo ependorf en hielo para las mitocondrias.
67. Dejar el BSA sobre hielo
68. Quitar SN
69. Agregar al pellet: 0.5ml (500 µl) de BSA más 2.5ml de b. a., para un total de 3ml
70. Agitar un poco con movimientos circulares
71. Apagar aire acondicionado
72. Balancear dos tubos (homogeneizado y agua)
73. Prender aire acondicionado
74. Centrifugar a 6900g (rpm= 8059) a 4°C por 10 min
75. Quitar sobrenadante
76. Resuspender las mitocondrias en 110µl de b. a.
77. Pipetear muy suave 2 o 3 veces, dejar reposar,
78. Se pasa al tubo ependorf y se conserva en hielo
79. Se mide proteína por el espectrofotómetro.

Anexo II

Determinación de proteína mitocondrial por absorbancia en el ultravioleta (UV)*

Glick, B. S., & Pon, L. A. 1995. Methods in Enzymology.

Método realizado en Laboratorio 2. Bioquímica y Bioenergética. UBIMED, a cargo de la Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid, y la técnico M. en C. Tecilli Cabellos Avelar

1. Prender el espectro BioMate 3 Thermo (se prende con un botón en la parte de atrás)
2. Esperar a que se calibre
3. Limpiar la celdilla tipo C6 con un paño especial
4. Poner 1 ml de SDS al 0.6% en la celdilla, como blanco
5. Una vez calibrado (longitud de onda de 280nm) oprimir ATC básico
6. Oprimir Medir blanco
7. Poner la celdilla con SDS, y se medirá automáticamente el blanco
8. Sacar la celdilla
9. Agregar 10 microlitros de mitocondrias a la celdilla con SDS
10. Pipetear mucho y hacer burbujas
11. Limpiar celdilla
12. Meter la celdilla al espectro, y se medirá automáticamente
13. Registrar datos de absorbancia y realizar los cálculos de acuerdo con el **Anexo III**

*Método utilizado para muestras con poca cantidad de mitocondrias.

Anexo III

Procedimiento para obtener los microlitros (μl) de mitocondria que se utilizarán en 1 mililitro (ml) de suspensión.

Cálculos generales:

| |
|-------------------------------------|
| 0.12 abs \longrightarrow 10 mg/ml |
|-------------------------------------|

Ejemplo:

$$0.12 \text{ abs} \text{-----} 10 \text{ mg/ml}$$

$$0.100 \text{ abs} \text{-----} X$$

$\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ La abs que se obtuvo del espectro
 $X = 8.33 \text{ mg/ml}$

$$8.33 \text{ -----} 1000 \mu\text{l (1ml)}$$

$$0.085 \text{ -----} X$$

$$\underline{X = 10.2 \mu\text{l}}$$

Se realiza una lista con todas las concentraciones ya establecidas, y en orden en el que se pondrán en 1 ml

LISTA:

| | | |
|-------------------|---------------------|--|
| 1. Buffer----- | 967.4 μl | \longrightarrow se saca sumando todo y restándole 1000 |
| 2. Malato----- | 4.8 μl | } Se suman y se restan a 1000 |
| 3. Piruvato ----- | 4.8 μl | |
| 4. Mitos ----- | 10.2 μl | |
| 5. ADP1 ----- | 3.6 μl | |
| 6. ADP2 ----- | 9.2 μl | |
| | <u>32.6</u> | |
| | <u>1000</u> | |
| | 967.4 | |

Anexo IV

Introducción de las partículas E171 en la vía sanguínea de los animales

Para ello, el animal será inmovilizado utilizando una cámara de acrílico (Figura 6), donde la cola quedará libre para la inyección. Para promover la vasodilatación y observar la vena, se colocará una compresa tibia ($30 - 35^{\circ} \text{C}$) cubriendo la cola de la rata, y se estimulará con alcohol al 70%, se repetirá el procedimiento, en caso de que no se logre ver la vena cauda. Se inyectará en la vena lateral desde un ángulo de 15 a 25° desde la parte distal, sin insertar la aguja más allá del bisel ya que la vena no es tan profunda, e inyectando lo más lento posible para no lastimar a la rata (Figura A1). Se presionará un poco la zona después de la inyección para evitar sangrado. Y por último se pondrá un poco de alcohol sobre la zona de inyección.



Figura A1. Modo de inyección por vía intravenosa en la vena caudal de la rata.

Anexo V

Proceso (paso a paso) para la obtención del área, diámetro y número de mitocondrias por medio del programa Image J

- a) Las imágenes de microscopía (TEM) que se desean analizar se abren en formato JPG por medio del programa Image J

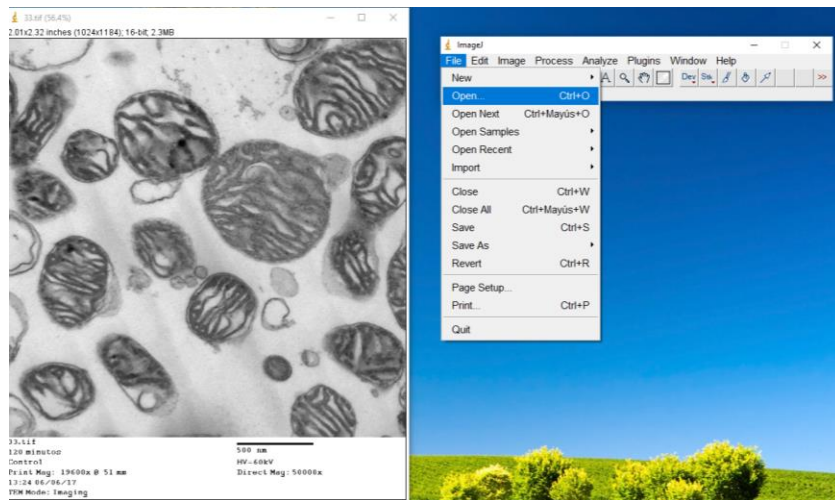


Figura A2. Primer paso en el procesamiento del ADI

- b) Una vez abierta la imagen, se calibra con la barra de escala que presenta la imagen, señalándola con la recta que tiene el programa y que el ángulo marcado sea de 0.00 grados

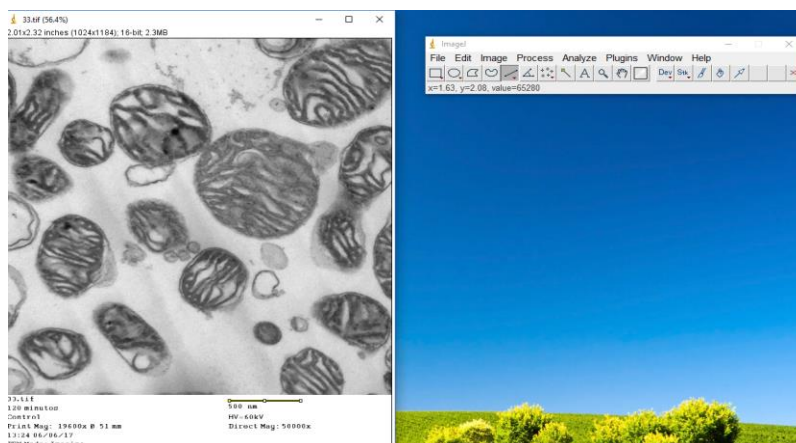


Figura A3. Forma de calibrar en el programa Image J

c) La barra de escala se examina de la siguiente manera:

Se posiciona en la casilla Analyze → Set Scale.

En la ventana siguiente en: distancia conocida, se marca la que tiene la imagen inicial, en este caso 500 y en unidades de longitud se escribe nm (nanómetros) y se marca la casilla de global

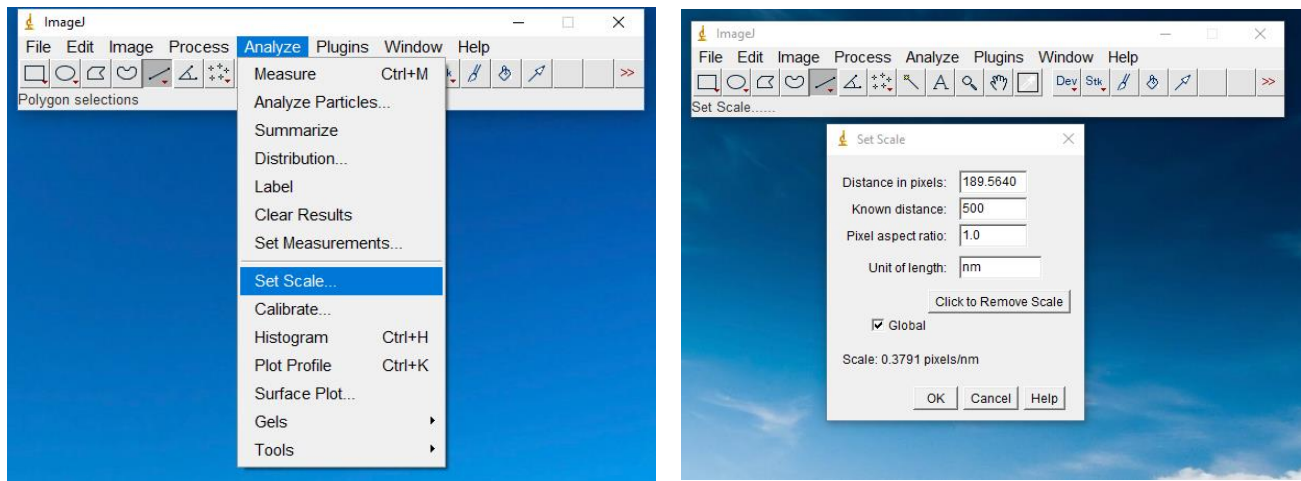


Figura A4. Forma de marcar las unidades en el programa ImageJ

d) Se selecciona la casilla de “rectangular” y, con esa opción se selecciona parte de la imagen que queremos trabajar, eliminando las partes de los datos

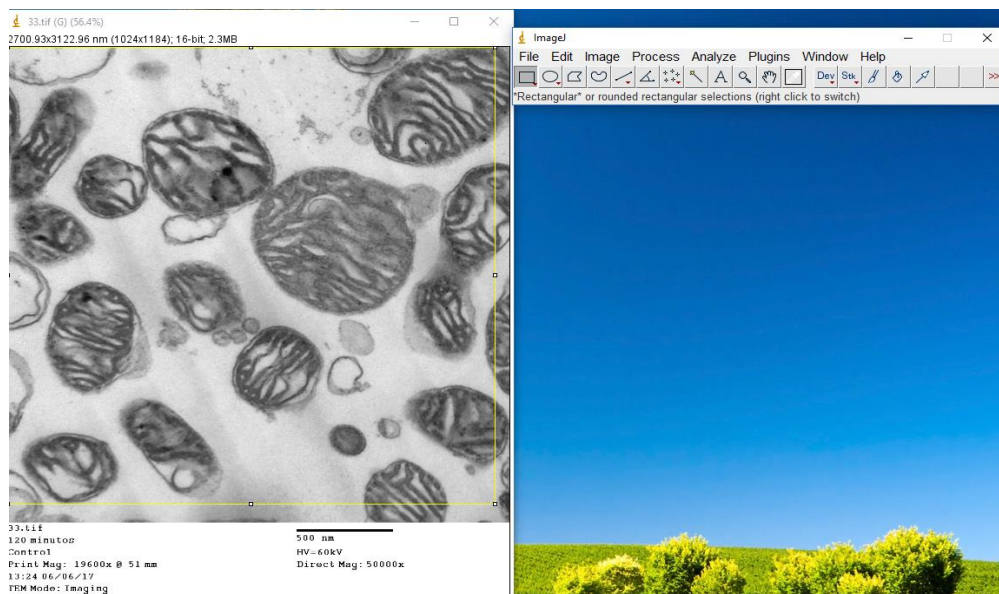


Figura A5. Selección de la Imagen que se va a trabajar.

- e) Se posiciona el cursor sobre la imagen seleccionada y con el click derecho se selecciona la opción de duplicar

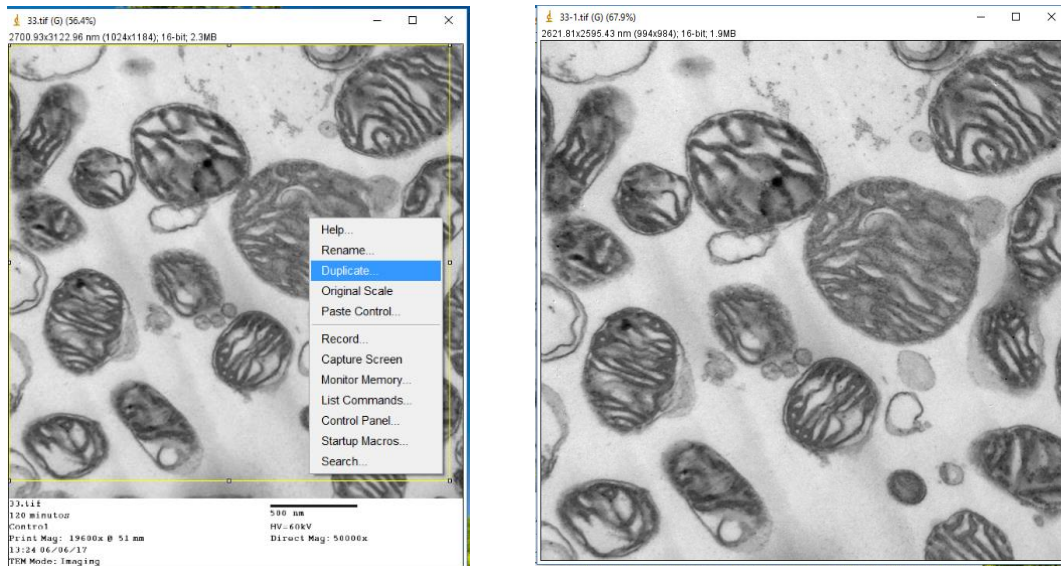


Figura A6. La imagen con la que se va a trabajar se duplica

- f) Posicionándose en esa imagen se selecciona la casilla de image → Adjust → Threshold, para obtener el ajuste de umbral que se desea

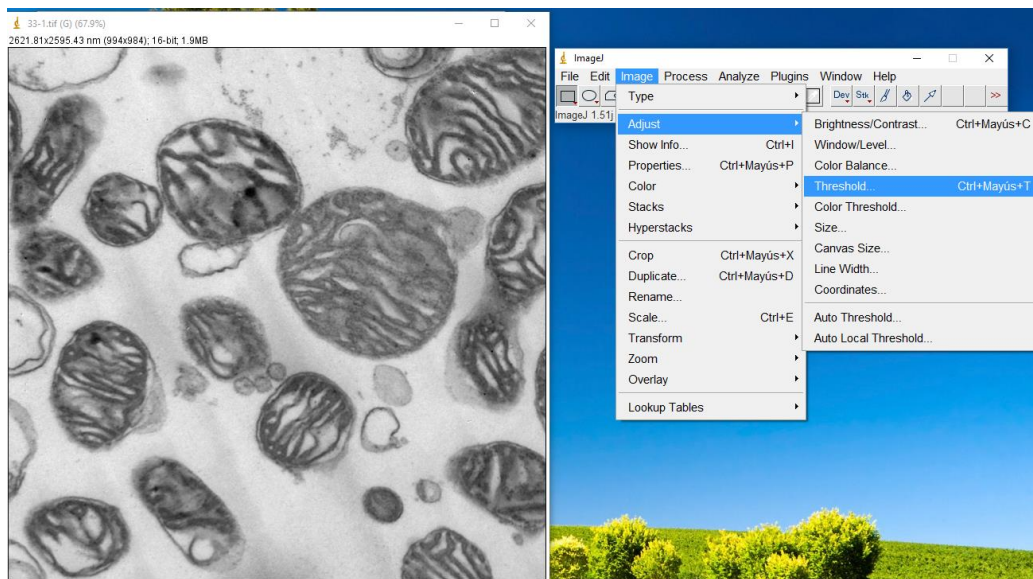


Figura A7. Modo de obtener el ajuste de umbral

- g) El ajuste de umbral se aplica a todas las imágenes analizadas por igual, para que no interfiera el valor del rango entre las imágenes. → apply

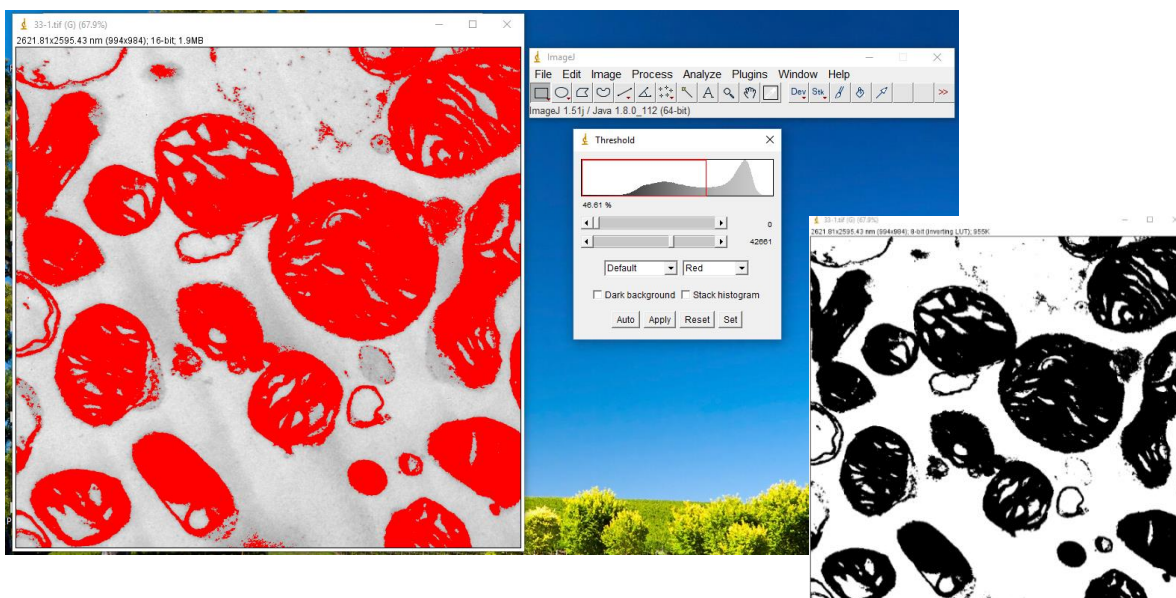


Figura A8. Obtención de la imagen binarizada

- h) Se trabaja con la imagen binarizada obtenida, en la cual con ayuda del pincel “Paintbrush Tool” se limpia la imagen hasta obtener solo las formas deseadas con ayuda de la original, eliminando pixeles no deseados, obteniendo una imagen binarizada limpia

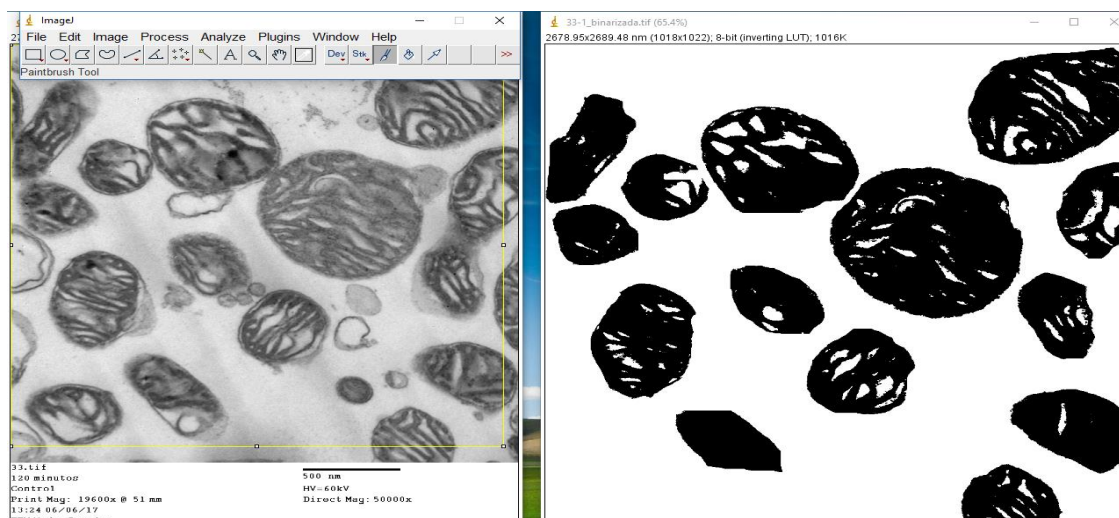


Figura A9. Forma de limpiar la imagen binarizada

- i) Una vez limpia la imagen binarizada se analizan las partículas que presenta la misma para obtener los parámetros deseados a mostrar. De la siguiente manera: Analyze → Set measurements → seleccionar casillas deseadas → ok

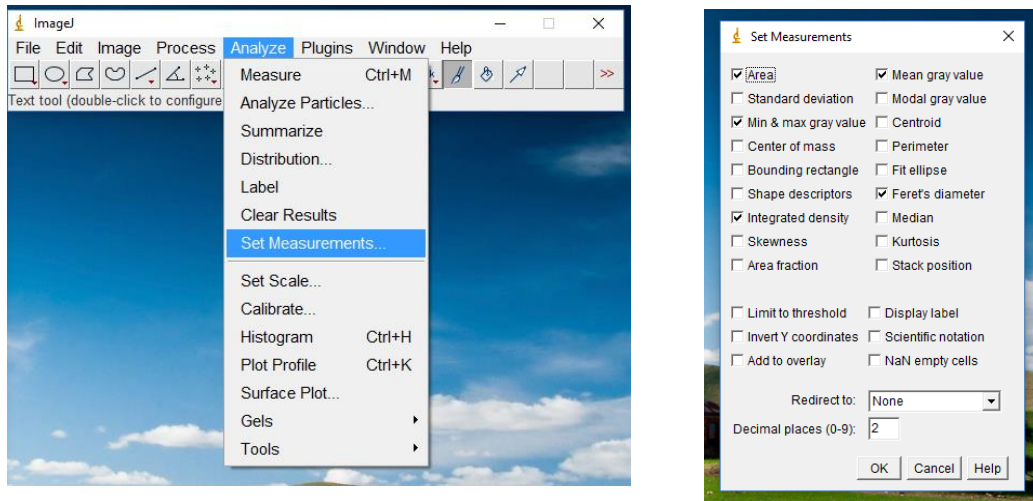


Figura A10. Selección de los parámetros deseados.

- Una vez seleccionadas las casillas deseadas, se prosigue a seleccionar la casilla de contornos para que el programa analice otros pixeles
 Analyze → Analyze particles → show: outlines → seleccionar casillas deseadas → ok

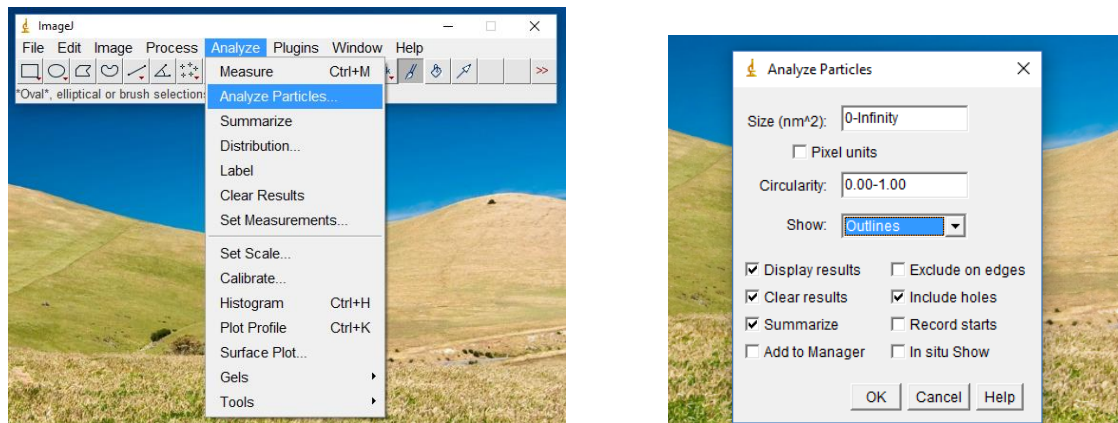


Figura A11. Selección de casillas por analizar por cada partícula de la imagen binarizada

- j) Una vez analizadas las partículas, el programa arroja varias ventanas incluyendo una imagen más (analizada) que representa el procesamiento de la imagen binarizada. Los datos pueden ser seleccionados y pasados a un archivo Excel o a otro, para su posterior análisis estadístico

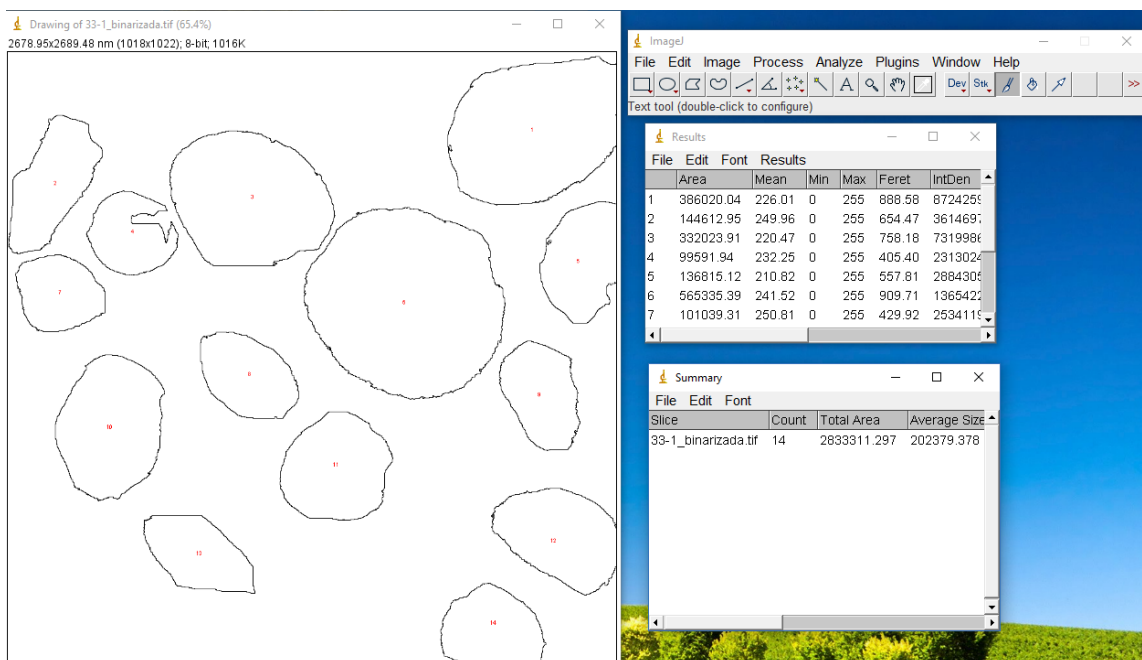


Figura A12. Obtención de la imagen analizada

Anexo VI

Trazos de la actividad respiratoria de mitocondrias aisladas del hemisferio derecho de cerebro de rata

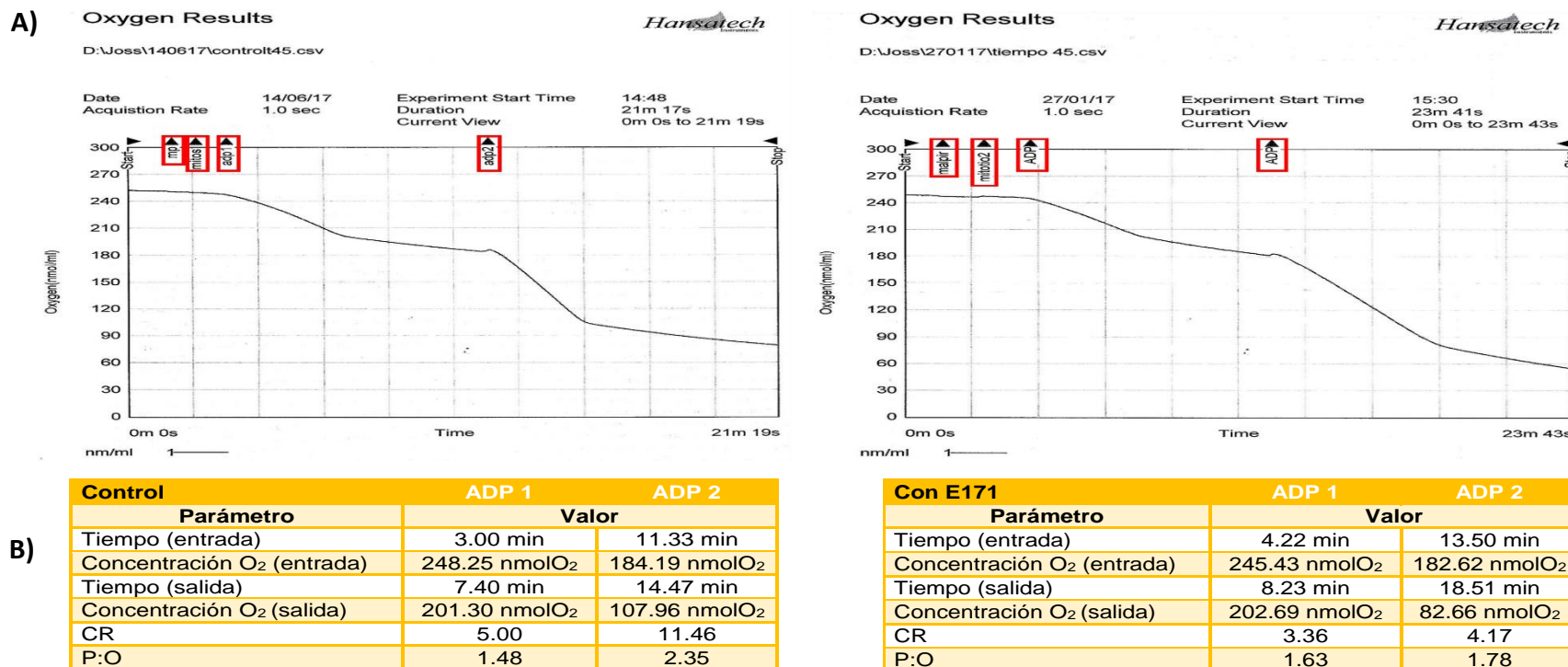
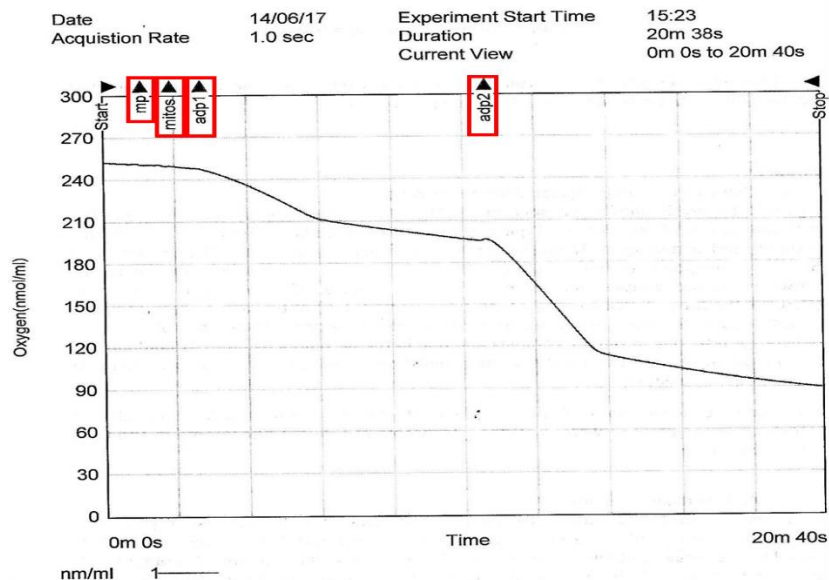


Figura A13. A). Trazos originales del consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas del hemisferio derecho de cerebro de rata control (izquierda) y expuestas a partículas de E171 (derecha) incubadas durante 45 min. Se observan en recuadros rojos la adición de los sustratos (malato/piruvato), seguido de las mitocondrias y la primera adición de ADP 1 (0.14mM), por último se marca la última adición de ADP 2 (0.36 mM). **B).** Valores de velocidad de cada trazo correspondiente a cada adición de ADP. Los datos son obtenidos al momento de adicionar ADP y después de que este se agota (cambio de pendiente), además se muestra el CR y P:O de cada trazo correspondiente. Los trazos y valores de velocidad fueron obtenidos del software O₂ view 2013 de Hansatech, UK.

A) Oxygen Results



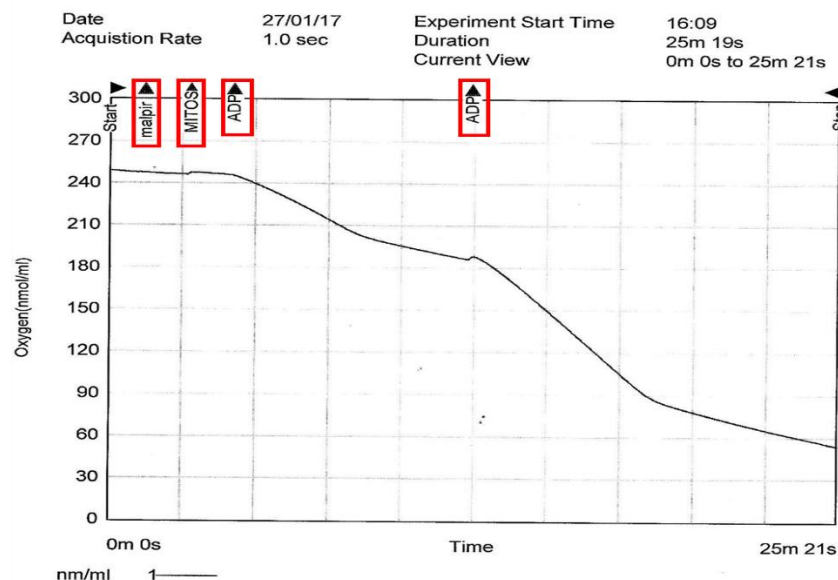
D:\Joss\140617\controlt60.csv



Oxygen Results



D:\Joss\270117\tiempo 60.csv

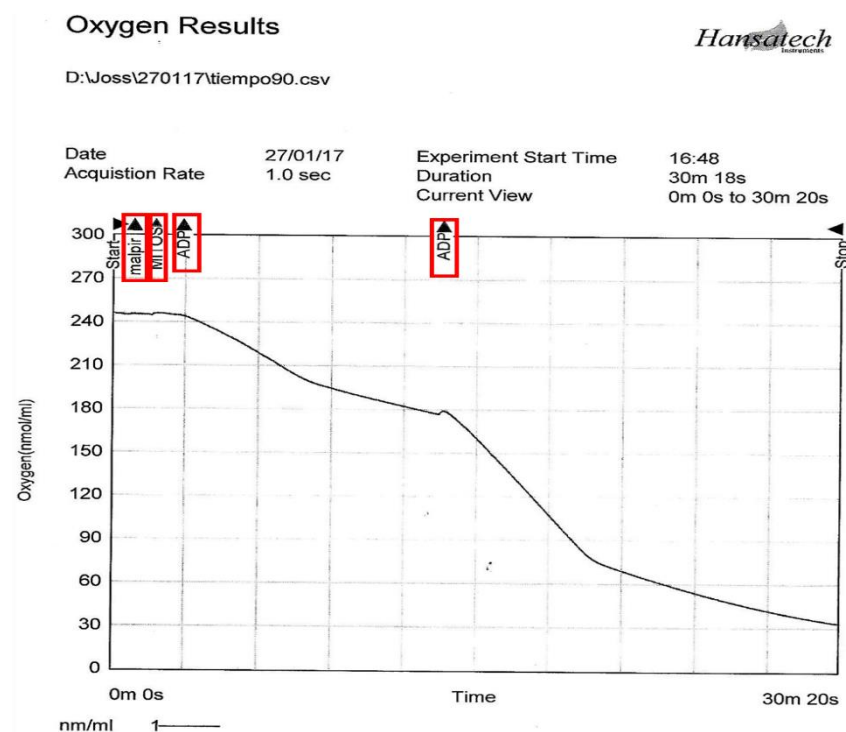
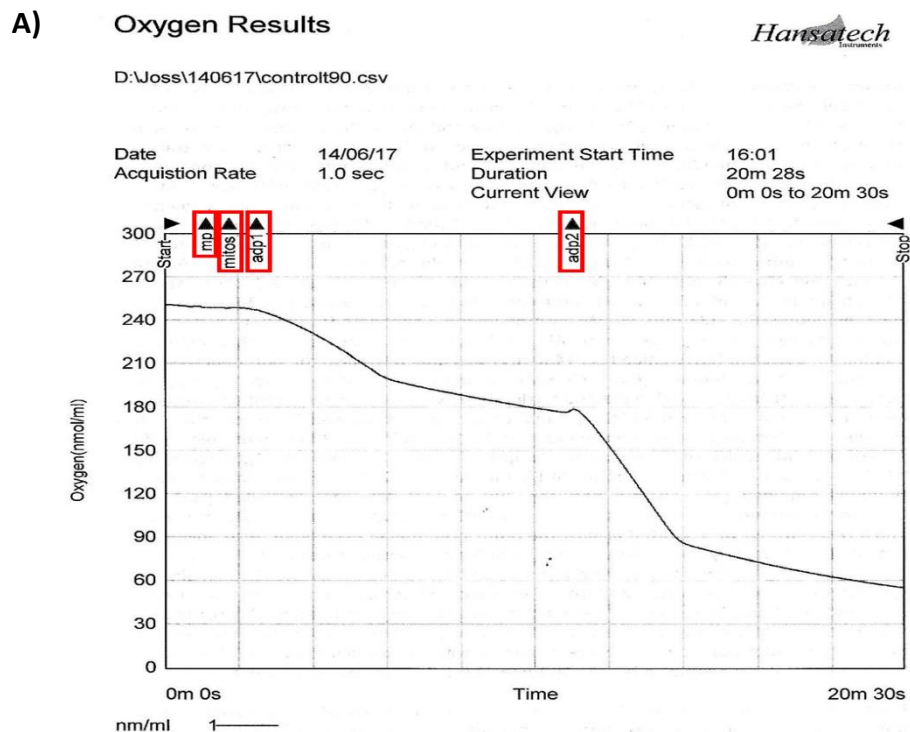


B)

| Control | ADP 1 | ADP 2 |
|--|---------------------------|---------------------------|
| Parámetro | Valor | |
| Tiempo (entrada) | 2.35 min | 10.44 min |
| Concentración O ₂ (entrada) | 248.24 nmolO ₂ | 195.82 nmolO ₂ |
| Tiempo (salida) | 6.10 min | 13.58 min |
| Concentración O ₂ (salida) | 213.09 nmolO ₂ | 119.12 nmolO ₂ |
| CR | 4.01 | 11.06 |
| P:O | 1.98 | 2.33 |

| Con E171 | ADP 1 | ADP 2 |
|--|---------------------------|---------------------------|
| Parámetro | Valor | |
| Tiempo (entrada) | 4.12 min | 12.37 min |
| Concentración O ₂ (entrada) | 243.95 nmolO ₂ | 187.97 nmolO ₂ |
| Tiempo (salida) | 8.45 min | 18.58 min |
| Concentración O ₂ (salida) | 202.80 nmolO ₂ | 86.65 nmolO ₂ |
| CR | 2.90 | 4.12 |
| P:O | 1.69 | 1.76 |

Figura A14. A). Trazos originales del consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas del hemisferio derecho de cerebro de rata control (izquierda) y expuestas a partículas de E171 (derecha) incubadas durante 60 min. Se observan en recuadros rojos la adición de los sustratos (malato/piruvato), seguido de las mitocondrias y la primera adición de ADP 1 (0.14mM), por último se marca la última adición de ADP 2 (0.36 mM). **B).** Valores de velocidad de cada trazo correspondiente a cada adición de ADP. Los datos son obtenidos al momento de adicionar ADP y después de que este se agota (cambio de pendiente), además se muestra el CR y P:O de cada trazo correspondiente. Los trazos y valores de velocidad fueron obtenidos del software O₂ view 2013 de Hansatech, UK.



B)

| Control | ADP 1 | ADP 2 |
|--|---------------------------|---------------------------|
| Parámetro | Valor | |
| Tiempo (entrada) | 2.13 min | 11.00 min |
| Concentración O ₂ (entrada) | 248.37 nmolO ₂ | 176.76 nmolO ₂ |
| Tiempo (salida) | 6.50 min | 14.90 min |
| Concentración O ₂ (salida) | 200.45 nmolO ₂ | 89.59 nmolO ₂ |
| CR | 4.64 | 10.38 |
| P:O | 1.45 | 2.05 |

| Con E171 | ADP 1 | ADP 2 |
|--|---------------------------|---------------------------|
| Parámetro | Valor | |
| Tiempo (entrada) | 2.55 min | 13.44 min |
| Concentración O ₂ (entrada) | 244.40 nmolO ₂ | 178.96 nmolO ₂ |
| Tiempo (salida) | 8.18 min | 20.70 min |
| Concentración O ₂ (salida) | 198.50 nmolO ₂ | 76.28 nmolO ₂ |
| CR | 2.97 | 4.39 |
| P:O | 1.52 | 1.74 |

Figura A15. A). Trazos originales del consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas del hemisferio derecho de cerebro de rata control (izquierda) y expuestas a partículas de E171 (derecha) incubadas durante 90 min. Se observan en recuadros rojos la adición de los sustratos (malato/piruvato), seguido de las mitocondrias y la primera adición de ADP 1 (0.14mM), por último se marca la última adición de ADP 2 (0.36 mM). **B).** Valores de velocidad de cada trazo correspondiente a cada adición de ADP. Los datos son obtenidos al momento de adicionar ADP y después de que este se agota (cambio de pendiente), además se muestra el CR y P:O de cada trazo correspondiente. Los trazos y valores de velocidad fueron obtenidos del software O₂ view 2013 de Hansatech, UK.

Anexo VII

Valores de los diferentes parámetros de la función respiratoria de mitocondrias aisladas del hemisferio derecho de cerebro de rata.

Tabla A1. Parámetros de la función respiratoria de mitocondrias control en todos los intervalos de tiempo, los cuales representan los valores de la primera adición de ADP (0.14 mM). Además se muestran los promedios de todas las repeticiones en cada parámetro.

| | CR | P:O | Estado 3 | Estado 4 | Repolarización | Fase lag |
|--------------|------|------|----------|----------|----------------|----------|
| Control, t45 | 2.99 | 1.70 | 174.35 | 58.35 | 40.96 | 4.03 |
| | 3.74 | 1.48 | 82.35 | 22.00 | 46.95 | 10.73 |
| | 5.00 | 1.48 | 178.12 | 35.65 | 46.95 | 4.40 |
| | 4.95 | 1.47 | 160.82 | 32.47 | 47.42 | 4.66 |
| | 5.51 | 1.76 | 155.06 | 28.12 | 39.56 | 3.39 |
| Promedios | 4.44 | 1.58 | 150.14 | 35.32 | 44.37 | 5.44 |
| Control, t60 | 3.01 | 1.59 | 185.65 | 61.76 | 43.86 | 2.90 |
| | 3.39 | 1.59 | 72.59 | 21.41 | 43.89 | 9.86 |
| | 4.01 | 1.98 | 157.06 | 39.18 | 35.15 | 3.75 |
| | 3.77 | 1.47 | 168.71 | 44.71 | 47.41 | 3.54 |
| | 5.32 | 2.23 | 152.12 | 28.59 | 31.21 | 3.08 |
| Promedios | 3.90 | 1.77 | 147.22 | 39.13 | 40.30 | 4.63 |
| Control, t90 | 2.76 | 2.44 | 123.88 | 44.82 | 28.55 | 3.33 |
| | 4.53 | 2.02 | 72.00 | 15.88 | 34.53 | 8.21 |
| | 4.64 | 1.45 | 199.18 | 42.94 | 47.93 | 4.37 |
| | 5.67 | 1.96 | 142.00 | 25.06 | 35.47 | 3.51 |
| | 4.76 | 2.23 | 156.71 | 32.94 | 31.24 | 3.23 |
| Promedios | 4.47 | 2.02 | 138.75 | 32.33 | 35.54 | 4.53 |

Tabla A2. Parámetros de la función respiratoria de mitocondrias control en todos los intervalos de tiempo, los cuales representan los valores de la segunda adición de ADP (0.36 mM). Además se muestran los promedios de todas las repeticiones en cada parámetro.

| | CR | P:O | Estado 3 | Estado 4 | Repolarización | Fase lag |
|--------------|-------|------|----------|----------|----------------|----------|
| Control, t45 | 7.00 | 1.60 | 334.35 | 47.76 | 111.92 | 4.80 |
| | 4.11 | 2.38 | 86.00 | 20.94 | 75.21 | 12.72 |
| | 11.46 | 2.35 | 357.29 | 31.18 | 76.24 | 3.14 |
| | 9.22 | 2.18 | 331.88 | 36.00 | 81.93 | 3.92 |
| | 7.22 | 2.40 | 202.94 | 28.12 | 74.45 | 6.41 |
| Promedios | 7.80 | 2.18 | 262.49 | 32.80 | 83.95 | 6.20 |
| Control, t60 | 5.75 | 1.67 | 312.71 | 54.35 | 107.16 | 5.75 |
| | 4.39 | 1.48 | 96.00 | 21.88 | 121.03 | 16.96 |
| | 11.06 | 2.33 | 351.41 | 31.76 | 76.70 | 3.14 |
| | 12.06 | 2.04 | 373.18 | 30.94 | 87.58 | 3.19 |
| | 7.22 | 2.24 | 202.94 | 28.12 | 80.08 | 4.92 |
| Promedios | 8.10 | 1.95 | 267.25 | 33.41 | 94.51 | 6.79 |
| Control, t90 | 4.25 | 1.63 | 243.53 | 57.29 | 110.00 | 6.11 |
| | 6.77 | 1.92 | 99.53 | 14.71 | 93.04 | 12.92 |
| | 10.38 | 2.05 | 426.24 | 41.06 | 87.17 | 3.90 |
| | 9.13 | 2.51 | 339.29 | 37.18 | 71.38 | 3.16 |
| | 8.55 | 2.27 | 297.88 | 34.82 | 78.75 | 3.70 |
| Promedios | 7.82 | 2.08 | 281.29 | 37.01 | 88.07 | 5.96 |

Tabla A3. Parámetros de la función respiratoria de mitocondrias tratadas con E171 en todos los tiempos de exposición (45, 60 y 90 min), los cuales representan los valores de la primera adición de ADP (0.14 mM). Además se muestran los promedios de todas las repeticiones en cada parámetro.

| | CR | P:O | Estado 3 | Estado 4 | Repolarización | Fase lag |
|------------------|------|------|----------|----------|----------------|----------|
| Con E171, t45 | 2.24 | 1.74 | 129.88 | 58.08 | 39.50 | 7.20 |
| | 4.13 | 1.24 | 186.71 | 45.18 | 56.05 | 4.17 |
| | 3.36 | 1.63 | 146.47 | 43.53 | 42.74 | 4.01 |
| | 3.55 | 1.65 | 96.12 | 27.06 | 42.26 | 6.91 |
| | 3.03 | 1.41 | 132.00 | 43.53 | 49.37 | 5.17 |
| Promedios | 3.26 | 1.53 | 138.24 | 43.47 | 45.98 | 5.49 |
| Con E171, t60 | 2.49 | 1.83 | 140.96 | 56.51 | 37.51 | 6.13 |
| | 2.95 | 1.21 | 168.24 | 56.94 | 57.67 | 4.93 |
| | 2.90 | 1.69 | 131.88 | 45.53 | 41.15 | 4.33 |
| | 3.32 | 1.68 | 136.82 | 41.18 | 41.42 | 4.93 |
| | 3.04 | 1.40 | 128.94 | 42.35 | 49.71 | 4.82 |
| Promedios | 2.94 | 1.56 | 141.37 | 48.50 | 45.49 | 5.03 |
| Con E171, t90 | 2.85 | 1.45 | 200.59 | 70.31 | 47.30 | 5.13 |
| | 2.83 | 1.18 | 161.41 | 57.06 | 58.96 | 7.11 |
| | 2.97 | 1.52 | 121.18 | 40.82 | 45.91 | 5.63 |
| | 3.04 | 1.56 | 95.41 | 31.41 | 44.72 | 6.90 |
| | 2.71 | 1.40 | 107.39 | 39.65 | 49.93 | 6.06 |
| Promedios | 2.88 | 1.42 | 137.20 | 47.85 | 49.36 | 6.17 |

Tabla A4. Parámetros de la función respiratoria de mitocondrias tratadas con E171 en todos los tiempos de exposición (45, 60 y 90 min), los cuales representan los valores de la segunda adición de ADP (0.36 mM). Además se muestran los promedios de todas las repeticiones en cada parámetro.

| | CR | P:O | Estado 3 | Estado 4 | Repolarización | Fase lag |
|------------------|------|------|----------|----------|----------------|----------|
| Con E171, t45 | 3.06 | 1.61 | 230.39 | 75.35 | 111.75 | 10.14 |
| | 4.81 | 1.50 | 317.18 | 65.88 | 119.06 | 5.06 |
| | 4.17 | 1.78 | 229.76 | 55.06 | 99.97 | 5.01 |
| | 3.81 | 1.82 | 170.24 | 44.71 | 97.98 | 8.01 |
| | 4.81 | 1.68 | 224.71 | 46.71 | 106.24 | 6.14 |
| Promedios | 4.13 | 1.68 | 234.45 | 57.54 | 107.00 | 6.87 |
| Con E171, t60 | 3.52 | 1.63 | 230.00 | 65.31 | 110.73 | 10.15 |
| | 7.03 | 1.41 | 271.29 | 38.59 | 126.80 | 5.62 |
| | 4.12 | 1.76 | 211.29 | 51.29 | 101.32 | 6.21 |
| | 5.40 | 2.08 | 221.76 | 41.06 | 85.82 | 5.06 |
| | 5.15 | 1.66 | 220.59 | 42.82 | 107.34 | 5.99 |
| Promedios | 5.04 | 1.71 | 230.99 | 47.82 | 106.40 | 6.61 |
| Con E171, t90 | 4.96 | 1.58 | 301.37 | 60.80 | 114.07 | 8.64 |
| | 6.35 | 1.32 | 268.82 | 42.35 | 135.09 | 6.44 |
| | 4.39 | 1.74 | 218.35 | 49.76 | 102.68 | 7.26 |
| | 4.08 | 1.82 | 172.59 | 42.35 | 98.13 | 7.79 |
| | 3.56 | 1.73 | 171.65 | 48.24 | 103.15 | 8.75 |
| Promedios | 4.66 | 1.64 | 226.56 | 48.70 | 110.62 | 7.78 |