

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Cambios inducidos por tolueno y xileno en el estado
energético y oxidativo de mitocondrias aisladas**

TESIS

para optar el grado académico de Magíster en Toxicología

AUTOR

Andrés Salvador Revilla Casalino

ASESORES

Carlos Curti

María Elizabeth González Loayza

Lima – Perú

2008

DEDICATORIA

*A Ana, mi esposa,
en el primer año de nuestra unión,
benedicida por Dios.*

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al jurado evaluador y calificador, Dra. Luz Oyola, Dra. Eloísa Hernández, Mg. Norma Carlos y Mg. Moisés García, por sus comentarios y sugerencias.

A mi asesora Dra. Elizabeth Gonzales por su amistad, comentarios, sugerencias y continuo apoyo a lo largo de la realización del presente trabajo.

Un reconocimiento especial a mi asesor en la Universidad de São Paulo, Dr. Carlos Curti, por hacer posible mi estancia de investigación en la FCFRP donde se realizaron los ensayos presentados en esta tesis.

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin la movilidad concedida por la Red de Macrouiversidades de América Latina y el Caribe, la gestión de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y la apertura de la Universidad de São Paulo.

INDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 4 |
| INTRODUCCIÓN | 7 |
| OBJETIVOS | 9 |
| MARCO TEÓRICO | 10 |
| | |
| I. CARACTERÍSTICAS QUÍMICO-TOXICOLÓGICAS DE LOS SOLVENTES AROMÁTICOS TOLUENO Y XILENO | 10 |
| | |
| II. IMPORTANCIA DE LAS FUNCIONES MITOCONDRIALES EN LA FISIOLOGÍA CELULAR | 12 |
| <i>Cadena de transporte de electrones</i> | 12 |
| <i>Respiración mitocondrial</i> | 13 |
| <i>Generación de especies reactivas de oxígeno</i> | 14 |
| <i>Fosforilación oxidativa</i> | 15 |
| <i>Transporte de calcio</i> | 17 |
| <i>Transición de permeabilidad mitocondrial</i> | 22 |
| | |
| PARTE EXPERIMENTAL | 25 |
| | |
| I. MATERIALES Y MÉTODOS | 25 |
| <u><i>Equipos e instrumentos</i></u> | 25 |
| <u><i>Reactivos</i></u> | 25 |

| | |
|--|----|
| <u>Métodos</u> | 26 |
| <i>Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata</i> | 26 |
| <i>Medio de incubación</i> | 28 |
| <i>Soluciones de tolueno y xileno</i> | 28 |
| <i>Monitoreo de la respiración mitocondrial</i> | 28 |
| <i>Monitoreo del potencial de la membrana mitocondrial</i> <i>interna</i> | 29 |
| <i>Estimación de la liberación de Ca²⁺</i> | 31 |
| <i>Monitoreo de la formación de H₂O₂</i> | 32 |
| <i>Estimación del hinchamiento mitocondrial</i> | 33 |
| <i>Determinación de ATP</i> | 34 |
| II. RESULTADOS | 36 |
| <u><i>Efectos de tolueno y xileno sobre procesos asociados a</i></u> <u><i>energía en mitocondrias de hígado de rata: respiración,</i></u> <u><i>potencial de membrana y liberación de Ca²⁺</i></u> | 36 |
| <u><i>Efectos de tolueno y xileno sobre la generación de EROs</i></u> <u><i>y el hinchamiento mitocondrial</i></u> | 39 |
| <u><i>Efecto de tolueno y xileno sobre los niveles mitocondriales</i></u> <u><i>de ATP</i></u> | 43 |
| III. DISCUSIÓN | 48 |
| IV. CONCLUSIONES | 51 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 52 |

RESUMEN

Tolueno y xileno son compuestos químicos presentes en varios solventes y otros productos industriales y de laboratorio; su toxicidad para el sistema nervioso central y el hígado ha sido bien documentada. En el presente trabajo, se han estudiado los efectos *in vitro* de tolueno y de xileno sobre la respiración de mitocondrias aisladas de hígado de rata energizadas con succinato evaluada por medición del consumo de oxígeno, el potencial de membrana usando safranina O como indicador, la liberación de Ca^{2+} usando Calcium Green 5N, la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) con ácido homovanílico, y los cambios en el nivel de ATP utilizando el sistema luciferina-luciferasa. El hinchamiento mitocondrial, dependiente de Ca^{2+} , sensible a ciclosporina A, un indicador de transición de permeabilidad de la membrana (TPM) mitocondrial, fue monitoreado con la medición de la disminución de la absorbancia aparente a 540 nm. Tolueno y xileno, a concentraciones 0.5-2.5 y 0.25-1 mM, respectivamente, estimularon la respiración de estado 4 en asociación aparente con la disipación del potencial de membrana y la liberación de Ca^{2+} ; estos efectos de ambos solventes indican desacoplamiento mitocondrial. A concentraciones mayores (2.5 y 5 mM, respectivamente), tolueno y xileno también inhibieron el estado 3 de respiración. A concentraciones 0.1-1 mM, xileno ocasionó una producción significativa de EROs y un hinchamiento mitocondrial parcialmente dependiente de Ca^{2+} y parcialmente sensible a ciclosporina A. A una concentración 1mM, tolueno o xileno causaron depleciones del ATP mitocondrial hasta niveles del 66.3% y 40.3%, respectivamente; las depleciones fueron sólo ligeramente dependientes de Ca^{2+} . Se concluyó que el desacoplamiento mitocondrial causante de la depleción de ATP puede ser responsable de la toxicidad

celular de tolueno y en particular, de xileno, descrita por otros investigadores. En el último caso, parecen también estar involucrados la TPM y la generación de EROs.

Palabras clave: Tolueno, Xileno, Mitocondria, Desacoplamiento, Especies Reactivas de Oxígeno.

SUMMARY

Toluene and xylene are chemicals present in various solvents and other industrial and laboratory products; their toxicity to the nervous system and to the liver has been well documented. In the present work, we have studied in vitro effects of toluene and xylene on the respiration of succinate-energized isolated rat liver mitochondria, evaluated by measuring oxygen consumption, membrane potential using safranin O as indicator, Ca^{2+} release using calcium green 5N, reactive oxygen species (ROS) by homovanillic acid, and ATP level changes using the luciferin-luciferase system. Ca^{2+} -dependent, cyclosporine A-sensitive mitochondrial swelling, an indicator of mitochondrial permeability transition (MPT), was followed by measuring the decrease of apparent absorbance at 540 nm. At 0.5-2.5 and 0.25-1 mM concentrations respectively, toluene and xylene stimulated state 4 respiration in apparent association with mitochondrial membrane potential dissipation and Ca^{2+} release; these effects of both solvents indicate mitochondrial uncoupling. At higher concentrations (2.5 and 5 mM respectively) toluene and xylene also inhibited state 3 respiration. At 0.1-1 mM concentrations, xylene elicited significant ROS generation and partly Ca^{2+} -dependent and partly cyclosporine A-sensitive mitochondrial swelling. At 1 mM concentration, toluene or xylene caused depletions of mitochondrial ATP, amounting to respectively 66.3% and 40.3%; depletions were only slightly dependent on Ca^{2+} . It was concluded that mitochondrial uncoupling via ATP depletion might be responsible for the earlier described cell toxicity of toluene and in particular, of xylene. In the latter case, mitochondrial generated ROS and MPT also appear to be involved.

Keywords: Toluene; Xylene; Mitochondria; Uncoupling; Reactive oxygen species

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos utilizados como solventes son agentes químicos generalmente obtenidos por fraccionamiento del crudo de petróleo[1-3]; una gama de compuestos ampliamente utilizados en diversos campos de la actividad humana por sus características fisicoquímicas de hidrofobicidad y fácil evaporación adecuadas para una variedad de propósitos [4,5]. Las sustancias más representativas de este grupo son tolueno y la mezcla de sus derivados metilados *m*-, *o*- y *p*-xileno, utilizados en distintos procesos químicos, tanto en pequeña escala por laboratorios de investigación y desarrollo, como en producción a nivel industrial; se encuentran presentes en la forma de productos de consumo masivo, principalmente cumpliendo la función de solventes en pinturas y pegamentos. Tolueno y xileno se encuentran además en concentraciones importantes en productos combustibles como resultado del fraccionamiento incompleto del crudo de petróleo [1].

La producción y el consumo a gran escala de tolueno y xileno constituyen razones por las cuales la investigación de sus potenciales toxicológicos sobre diferentes sistemas biológicos es relevante. Por su toxicidad comprobada gran distribución y amplio uso estos agentes químicos siguen representando un riesgo para la salud de los seres humanos y del ambiente [6,7]. Ante el riesgo inminente por la presencia ubicua de estos hidrocarburos aromáticos en el medio en que vivimos es necesario continuar los esfuerzos investigativos que se han realizado intensamente para explicar los mecanismos que subyacen a su toxicidad.

Con la aplicación de conocimientos y técnicas de la Bioquímica, Farmacología y Toxicología, entre otras ciencias de la vida, es posible evaluar los efectos de los agentes químicos ajenos a los organismos vivos que actúan como xenobióticos en determinados sistemas biológicos *in vitro*, en células cultivadas o en organelas aisladas. Entre los sistemas biológicos más importantes que existen en todos los organismos se encuentran aquellos ligados al **metabolismo oxidativo** y a la **transducción de energía** [8]. En los organismos eucarióticos los eventos moleculares relacionados con estos procesos bioquímicos se efectúan principalmente a nivel mitocondrial. Por ello la mitocondria es considerada un blanco importante para la acción tóxica o farmacológica de los xenobióticos [9].

En el presente trabajo se inducen mediante los solventes aromáticos tolueno y xileno cambios en el estado energético y oxidativo de mitocondrias aisladas de hígado de rata monitoreados a través de una serie de ensayos *in vitro*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Inducir mediante los solventes aromáticos tolueno y xileno cambios en el estado energético y oxidativo de mitocondrias aisladas de hígado de rata.

Objetivos Específicos

Evaluar el efecto de distintas concentraciones de tolueno y xileno sobre procesos relacionados con la transducción de energía y el metabolismo oxidativo en mitocondrias aisladas.

Proponer mecanismos moleculares mitocondriales para los efectos tóxicos atribuidos a tolueno y xileno.

MARCO TEÓRICO

I. CARACTERÍSTICAS QUÍMICO-TOXICOLÓGICAS DE LOS SOLVENTES AROMÁTICOS TOLUENO Y XILENO

La figura 1 muestra las estructuras químicas de tolueno y de sus derivados metilados *m*-, *o*- y *p*-xileno, compuestos orgánicos volátiles (COVs) aromáticos incluidos en productos comerciales ampliamente distribuidos como gasolinas, pinturas, pegamentos y solventes. Adicionalmente a estos propósitos de utilización, tolueno y la mezcla de los tres isómeros de xileno son mal utilizados mundialmente como agentes neuroestimulantes mediante procedimientos de inhalación [10-13]. Se ha establecido la neurotoxicidad de tolueno y xileno que se expresa en efectos sobre el sistema nervioso central con narcosis, depresión severa y muerte, habilidad reducida en pruebas cognoscitivas y de función neuromuscular, así como disminución de la capacidad auditiva y visual, entre muchos otros efectos [14-17]. La hepatotoxicidad de tolueno y xileno se ha manifestado con alteraciones en la estructura y función hepática en trabajadores expuestos a estos solventes [18-20]

Los mecanismos de acción previamente descritos de tolueno y xileno incluyen generación de EROs y peroxidación lipídica, indicando que la mitocondria puede ser una diana potencial de estos y otros COVs [21-24]. De hecho, se han reportado estructuras mitocondriales defectuosas [25,26], así como disminución de la viabilidad celular, como consecuencia de la acción de estos compuestos [27-30].

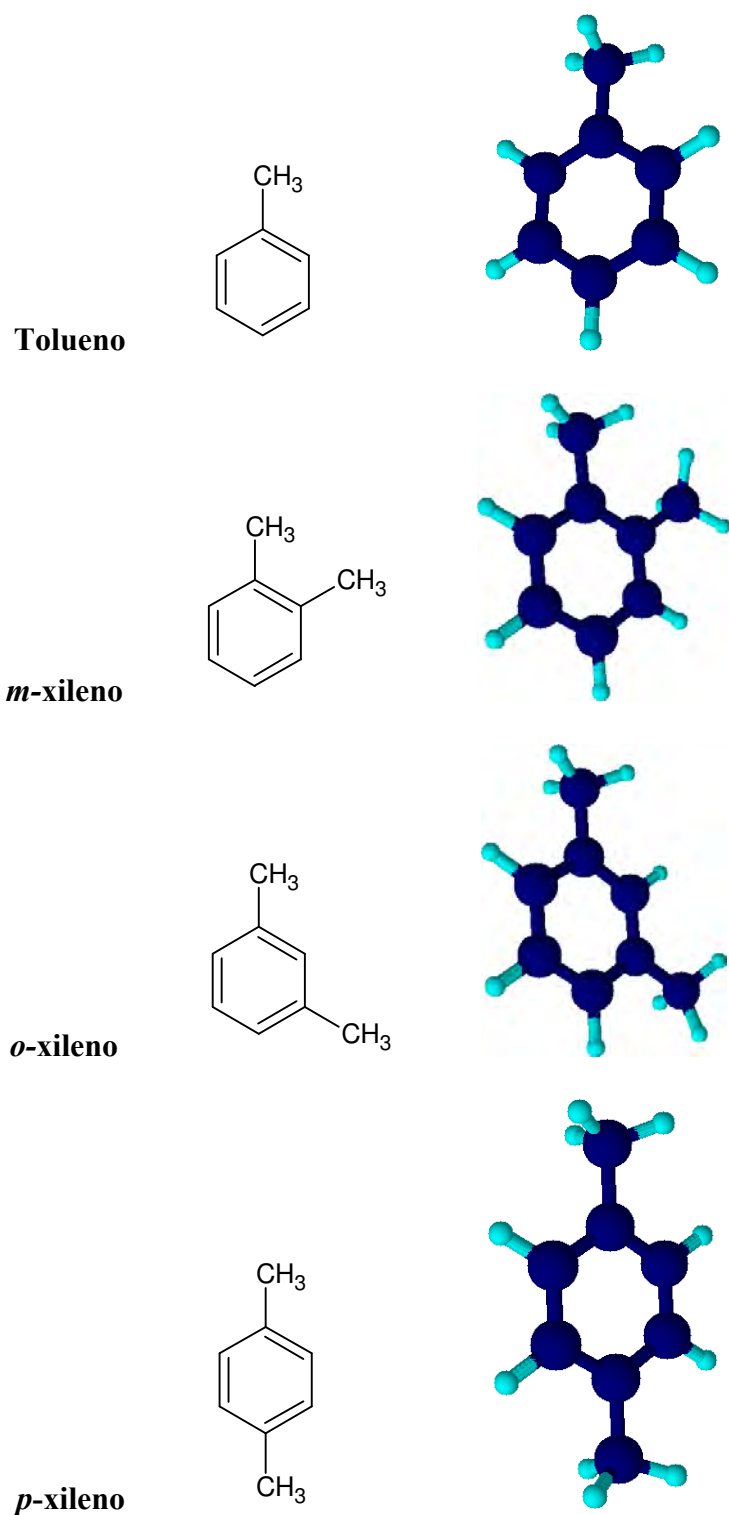


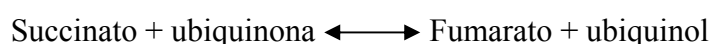
Figura 1. Estructuras químicas y arreglos tridimensionales moleculares de tolueno y de los tres isómeros de xileno. Las moléculas fueron diseñadas empleando el programa ACD, versiones libres para Windows Chemsketch 10.0 y 3D Viewer 10.0, de la empresa Advanced Chemistry Development, Inc.

II. IMPORTANCIA DE LAS FUNCIONES MITOCONDRIALES EN LA FISIOLÓGÍA CELULAR

Las mitocondrias son capaces de convertir la energía liberada por el transporte de electrones y de almacenarla como energía de enlace en las moléculas de adenosin trifosfato (ATP) [31]. La energía almacenada de este modo es utilizada por el organismo para realizar todo trabajo mecánico, biosintético y de transporte a nivel de la célula. Así, el ATP es un compuesto con un rol protagónico por lo que cualquier interferencia con su producción o utilización constituye un mecanismo a través del cual los xenobióticos pueden expresar toxicidad aguda o crónica [9].

Cadena de transporte de electrones

En la membrana mitocondrial interna existe un sistema de transporte de electrones cuyos componentes se agrupan en cuatro complejos habitualmente designados por numerales romanos [32-35]. Cada complejo contiene una serie de componentes de la cadena transportadora de electrones. Los componentes de los complejos sufren oxidación o reducción mientras participan en la transferencia de electrones a lo largo de la cadena. El **complejo I (NADP-CoQ reductasa)** es la más compleja y menos comprendida de las cuatro unidades. Media la oxidación del NADH intramitocondrial generado en el ciclo de Krebs y transfiere los electrones del NADH a la coenzima Q (ubiquinona). La **succinato-CoQ reductasa (complejo II)** media la transferencia de electrones del succinato generado en el ciclo de Krebs a la coenzima Q que es oxidada. La reacción que cataliza el complejo II se muestra simplificada en la siguiente ecuación:



El **complejo III (CoQ reducida-citocromo c reductasa)** media la transferencia de electrones desde la coenzima Q reducida al citocromo c. La citocromo c **oxidasa (complejo IV)** media la transferencia de electrones del citocromo c reducido al O₂ molecular. Se considera que la coenzima Q y el citocromo c son componentes móviles de la membrana mediando la transferencia de electrones entre los cuatro complejos enzimáticos.

Respiración mitocondrial

La reducción del oxígeno molecular a agua por la adición de cuatro electrones es la fuente principal de energía en la mayoría de organismos aerobios. Esta energía es almacenada temporalmente como un gradiente quimiosmótico a través de la membrana mitocondrial interna [36, 37].

El complejo IV debe reducir una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua, o en su defecto liberará alguna especie de oxígeno, tal como superóxido. Un mecanismo propuesto para esto consiste en un ciclo de actividad catalítica que empieza con cuatro centros en el sitio catalítico reducido, denotados como a₃, Cu_B, hemo y Cu_A. El oxígeno se une al centro a₃ para dar una forma oxi transitoria (etapa I). El enlace O-O se rompe (etapa II), liberando un grupo hidroxilo que quedará unido al centro Cu_B y una especie ferrilo (es decir, Fe⁴⁺=O) en el hemo. Esto requiere la transferencia de cuatro electrones a la molécula original de oxígeno: un electrón proveniente del Cu_B y dos del a₃ (dando el estado del ferrilo +4), mientras se argumenta que el cuarto electrón viene del lado de cadena de la tirosina unida a un ligando histidina del Cu_B. El radical de tirosina resultante no tiene carga al donar un protón al átomo de oxígeno que se convierte en un hidroxilo unido a Cu_B. En la etapa III, el hemo entrega un electrón a la tirosina, mientras

un protón es captado de la fase N (lado interno de la membrana mitocondrial interna) para reprotonar la tirosina [37,38].

La etapa IV requiere que la especie ferrilo sea reducida a especie hidroxilo férrico ($\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$), un proceso que requiere de un electrón y un protón, el último que proviene nuevamente de la fase N. El electrón es donado por el hemo, que sería re-reducido por transferencia de un electrón de Cu_A . El ciclo se completa (etapa v) con dos electrones y dos protones más que permitirán que se liberen las dos moléculas de agua y que se regenere el sitio catalítico reducido. El ciclo completo remueve cuatro protones de la fase N, que se encuentran con cuatro electrones en el sitio catalítico que se originan en el citocromo c desde la fase P (lado externo de la membrana mitocondrial interna).

Generación de especies reactivas de oxígeno

Ni el oxígeno molecular, debido a sus dos electrones desapareados, ni el agua, reaccionan muy fácilmente con las moléculas biológicas. Sin embargo, bajo una variedad de circunstancias, y especialmente en determinados procesos patológicos, se forman moléculas de oxígeno parcialmente reducidas y más reactivas. Las mitocondrias así también permanecen como las principales fuentes intracelulares y blanco importante de las especies reactivas de oxígeno (EROs).

La adición de un electrón al oxígeno molecular origina un anión superóxido formado espontáneamente (sin catálisis enzimática) en virtualmente todas las células aerobias como un resultado de la autooxidación de los constituyentes de la cadena de transporte de electrones. Dos moléculas de anión superóxido reaccionan simultánea o enzimáticamente como consecuencia de la actividad de la superóxido dismutasa para

formar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Así, el H_2O_2 casi siempre se forma bajo condiciones en las que se genera el anión superóxido [38, 39].

El enlace oxígeno-oxígeno del H_2O_2 puede ser escindido mediante la adición de un electrón, una reacción que origina el relativamente inocuo anión hidróxido y el altamente reactivo radical hidroxilo.

Fosforilación oxidativa

En asociación al transporte de electrones se produce la expulsión de protones de la matriz al espacio intermembranoso. El gradiente de concentración (quimiosmótico) de protones así originado a ambos lados de la membrana interna mitocondrial (impermeable al paso de protones) genera el potencial de membrana ($\Delta\psi$) que constituye el principal componente de la fosforilación oxidativa al impulsar la síntesis de ATP vía la F_1F_0 -ATP sintasa [40, 41].

La F_1F_0 -ATP sintasa está compuesta de una unidad conductora de protones (F_0) y una unidad catalítica (F_1). El flujo de protones a través de la unidad F_0 ocasiona la rotación de la subunidad γ que funciona como eje del complejo. El mecanismo rotacional depende de las estructuras de las subunidades **a** y **c** de F_0 . En la subunidad **c** cada cadena polipeptídica forma un par de α hélices que se extienden sobre la membrana. Un residuo aspartato (Asp 61) se encuentra en medio de la segunda hélice. Cuando Asp 61 entra en contacto con la parte hidrofóbica de la membrana, el residuo debe estar en la forma neutral de ácido aspártico en lugar de su forma aspartato. Entre 9 y 12 subunidades **c** se agregan en un anillo simétrico extendido sobre la membrana.

La subunidad **a** parece incluir en su estructura dos semi-canales de protones de tal modo que los protones pueden pasar por uno de estos canales, pero no pueden atravesar completamente la membrana. La subunidad **a** obstruye directamente el anillo compuesto de subunidades **c** con cada semi-canal interactuando directamente con una subunidad **c**. Si los residuos Asp 61 de dos subunidades **c** que están en contacto con un hemi-canal han donado sus protones de tal modo que se encuentran en la forma de aspartato, lo que es posible ya que están en un ambiente relativamente hidrofílico dentro del semi-canal. El anillo **c** no puede rotar en ambas direcciones por el impedimento de mover el residuo de aspartato (cargado) a la parte hidrofóbica de la membrana. Si el residuo aspartato es protonado a su forma neutra, el anillo **c** puede ahora rotar, pero sólo en dirección de las agujas del reloj.

Tal rotación mueve el residuo de ácido aspártico recientemente protonado para que esté en contacto con la membrana, mueve el residuo aspartato cargado del semi-canal de la matriz al semi-canal citosólico, y mueve un distinto residuo de ácido aspártico protonado de la membrana al semi-canal de la matriz. Luego el protón puede disociarse del ácido aspártico y moverse a través del semi-canal hacia el interior la matriz pobre en protones para reestablecer el estado inicial. Esta disociación es favorecida por la carga positiva de un residuo conservado de arginina (Arg 210) en la subunidad **a**. Así, la diferencia en la concentración de protones y el potencial en ambos lados de la membrana llevan a diferentes probabilidades de protonación a través de los dos semi-canales otorgando movimiento rotacional direccional.

Cada protón se mueve a través de la membrana pasando por el anillo **c** para salir por el semi-canal de la matriz. El anillo **c** se encuentra estrechamente ligado a las subunidades

γ y ϵ . Así, el anillo **c** gira, estas subunidades γ y ϵ también giran dentro del hexámero de 3 subunidades α y 3 subunidades β de la unidad F1. La columna exterior formada por dos cadenas **b** y la subunidad δ previenen la rotación del hexámero. De este modo, la rotación del anillo **c** originada por el gradiente de protones causa la rotación de la subunidad γ , que a su vez promueve la síntesis de ATP mediante un mecanismo de cambio de unión. El número de subunidades **c** en el anillo **c** oscila entre 10 y 14. Este número es importante porque determina el número de protones que deben transportarse para generar una molécula de ATP. Cada rotación de 360 grados de la subunidad γ origina la síntesis y la liberación de tres moléculas de ATP. Así, si existen 10 subunidades **c** en el anillo (tal como ha sido observado en la estructura cristalina de la ATP-sintasa mitocondrial de levadura), cada ATP generado requiere el transporte de $10/3 = 3.33$ protones. De esta manera el gradiente de concentración de protones formado a ambos lados de la membrana mitocondrial interna se encuentra acoplado con la síntesis de ATP a partir de ADP.

Los agentes desacopladores disipan el $\Delta\psi$, haciendo que la mitocondria no sea más capaz de sostener la síntesis de ATP [42]. Se cree que el desacoplamiento mitocondrial es un mecanismo relevante de la toxicidad de xenobióticos, especialmente en el hígado, el lugar principal de ingreso y metabolismo de estos compuestos.

Transporte de calcio

Las mitocondrias poseen en sí mismas una serie de reacciones enzimáticas que son sensibles a concentraciones de Ca^{2+} en el orden micromolar y que eventualmente proveen los equivalentes reductores para la cadena respiratoria [43, 44].

Las mitocondrias de vertebrados acumulan Ca^{2+} mediante un mecanismo de monotransporte (uniport) cuando son expuestas a concentraciones de Ca^{2+} en exceso de 0.5 a $1\mu\text{M}$. Tan solo 1 pmol mg^{-1} del colorante glicoproteico rojo de rutenio puede inhibir el canal monotransportador, indicando que su abundancia en la membrana mitocondrial interna es minúscula, lo que es consistente con los intentos fallidos, hasta la fecha, de identificar o clonar la proteína [45]. En el equilibrio el monotransportador de Ca^{2+} desarrollaría un gradiente de concentración a través de la membrana interna de no menos de 10s. Que esto no ocurra en la práctica se debe a la presencia de una vía independiente de liberación de Ca^{2+} , que en la mayoría de las mitocondrias opera como un contratransporte $\text{Ca}^{2+}/n\text{Na}^+$. Su estequiometría es controversial, siendo electroneutral, $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$ o electrogénica, $\text{Ca}^{2+}/3\text{Na}^+$. El intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ se encuentra en mitocondrias de la mayoría de tejidos, incluyendo el corazón, el cerebro y el tejido adiposo marrón [46].

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ puede ser inhibido por la droga CGP-37157 y por tetrafenilfosfonio, TPP^+ . Este último complica claramente los experimentos en los que el TPP^+ se utiliza simultáneamente para monitorear el $\Delta\psi$. Las mitocondrias hepáticas tienen un contratransportador de $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ independiente. Cada mecanismo impulsa la liberación de Ca^{2+} desde la matriz, requiriendo la vía acoplada a Na^+ la intervención adicional del intercambiador de Na^+/H^+ presentado anteriormente.

La existencia de la vía de liberación independiente puede ser demostrada más simplemente mediante la inhibición selectiva de la vía de recaptación con rojo de rutenio una vez que las condiciones de equilibrio se hayan obtenido. Como el inhibidor no afecta la vía de liberación, ocurre una liberación neta de Ca^{2+} desde la matriz. El

monotransportador puede además ser inhibido por otros cationes multivalentes, como Mg^{2+} y lantánidos [47]. La aparente circulación simétrica del Ca^{2+} a través de la membrana interna es impulsada mediante el circuito de protones y puede desde luego considerarse como un proceso ‘desacoplador’ que disipa energía. En la práctica, la razón de Ca^{2+} que circula se restringe por la actividad relativamente baja de la vía de liberación, de tal modo que no más que un pequeño porcentaje del estado 4 de respiración restante es utilizado para mantener la recirculación de Ca^{2+} [48].

Las dependencias distintivas de las vías de recaptación y liberación en la concentración citoplasmática y matricial, respectivamente, permiten que las mitocondrias actúen como almacenes de Ca^{2+} extramitocondrial y además que regulen la actividad de las enzimas de la matriz activadas por Ca^{2+} . La habilidad de las mitocondrias para acumular Ca^{2+} a partir de medio que contiene una concentración de Ca^{2+} mayor de $0.5\mu M$ es verdaderamente espectacular. Bajo condiciones apropiadas en exceso de Ca^{2+} $1\mu M$ por mg de proteína mitocondrial puede ser secuestrado en la matriz sin deterioro alguno de la integridad bioenergética, equivalente a una concentración de Ca^{2+} total que se aproxima a $1M$! Esta acumulación requiere la presencia de pirofosfato inorgánico (Pi), que es captado en paralelo. La entrada de Ca^{2+} disminuye el $\Delta\psi$, permitiendo que más protones sean expulsados por la cadena respiratoria. Si esto fuera el único proceso, la acumulación de Ca^{2+} se detendría tan pronto como el $\Delta\psi$ se convierta en ΔpH . Sin embargo, en presencia de Pi externo, el ΔpH en aumento causa que el Pi entre en la matriz vía el transportador de fosfato, que efectivamente intercambia $H_2PO_4^-$ por OH^- [49]. El transporte de fosfato tiene en este contexto dos funciones: primero, neutraliza el aumento en el pH interno; y, segundo, se compleja con el Ca^{2+} acumulado para formar un ‘gel’ de fosfato de calcio, que no es un precipitado convencional, ya que

instantáneamente se disocia cuando colapsa el $\Delta\psi$, permitiendo la liberación de Ca^{2+} a través del montransportador y de Pi por el transportador de fosfato. No obstante, el ‘gel’ es osmóticamente inactivo, previniendo el hinchamiento osmótico precedido por la acumulación de iones.

La actividad del montransportador de Ca^{2+} aumenta como segundo efecto del Ca^{2+} libre en el citoplasma. Cuando el Ca^{2+} extramitocondrial, $[\text{Ca}^{2+}]_e$, es suficientemente alto, la conductancia del montransportador es suficiente para la capacidad respiratoria total de la mayoría de mitocondrias mamíferas que se deben enteramente a la acumulación del catión [50]. Se ha descrito una vía de secuestro rápido de Ca^{2+} de baja capacidad en mitocondrias hepáticas, conocida como RAM (del inglés *rapid accumulation mode*, modo de acumulación rápida); sin embargo, la naturaleza de la neutralización de cargas en este proceso aún no está clara.

La acumulación continuará hasta que la mitocondria logre disminuir la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ a un nivel en el que la velocidad de captación y liberación se equilibren [47]. Cuando la matriz mitocondrial contiene concentraciones de Ca^{2+} mayores de 10 nmol por mg de proteína en presencia de Pi en concentraciones fisiológicas, la vía de liberación se vuelve independiente del contenido de Ca^{2+} en la matriz, debido aparentemente a que el Ca^{2+} libre en la matriz es esencialmente amortiguado mediante la formación del ‘gel’ de fosfato de calcio [48]. El valor de $[\text{Ca}^{2+}]_e$ en el que este equilibrio cinético ocurre se conoce como el “punto de ajuste” y varía de 0.3 a 1 μM dependiendo de las condiciones de incubación. En presencia de Pi, las mitocondrias aisladas intentan disminuir la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ al punto de ajuste y así parecen actuar como perfectos amortiguadores del $[\text{Ca}^{2+}]_e$. La mitocondria en la célula puede servir así como un almacén temporal de Ca^{2+}

bajo condiciones de Ca^{2+} local elevado [49]. Existe una considerable incertidumbre acerca del verdadero rango de valores de la concentración de Ca^{2+} libre en la matriz. Bajo condiciones de carga mínima de Ca^{2+} en que la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ se encuentra por debajo del punto de ajuste, las actividades de las enzimas activadas por Ca^{2+} en la matriz son consistentes con concentraciones de Ca^{2+} libre en la matriz en el rango de 0.5 a 2 μM , es decir, existe un gradiente de concentración insignificante a través de la membrana interna.

Son tres las enzimas cuyas actividades pueden ser reguladas por las concentraciones de Ca^{2+} libre en la matriz en el rango 0.1 – 1 μM [52]:

- (a) La Piruvato deshidrogenasa fosfatasa, que retira el P_i del complejo piruvato deshidrogenada fosforilado (inactivo), permitiendo así que la V_{max} del complejo aumente.
- (b) El K_m de la isocitrato deshidrogenasa ligada a NAD^+ para isocitrato es disminuido por Ca^{2+} , permitiendo un flujo dado a través del ciclo del ácido cítrico que se conseguirá a una concentración de sustrato disminuida.
- (c) La afinidad por el sustrato de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa también se incrementa cuando el Ca^{2+} está en este rango de concentración.

Existen un número de condiciones en las que una respuesta hormonal que requiere una demanda aumentada de ATP resulta en Ca^{2+} citoplasmático elevado, que es relevado, a través de la circulación en estado de equilibrio, en Ca^{2+} libre en la matriz elevado. En consecuencia se aumenta la actividad del ciclo del ácido cítrico y así la reducción del NAD^+ para minimizar la caída del $\Delta\psi$, que de otro modo acompañaría la depleción del ATP. En términos más amplios, este aspecto del transporte mitocondrial de Ca^{2+} es más

significante en células no excitables cuyo Ca^{2+} citoplasmático no sufre grandes excursiones, mientras que el amortiguamiento del Ca^{2+} puede ser más relevante en células excitables, particularmente neuronas, en las que los canales iónicos pueden inducir elevaciones agudas dramáticas del Ca^{2+} citoplasmático.

Transición de permeabilidad mitocondrial

En asociación con Ca^{2+} , las EROs pueden producir la transición de permeabilidad mitocondrial (TPM), un proceso mediado por la apertura de poros de transición de permeabilidad de membrana (PTP), demostrados por el hinchamiento sensible a ciclosporina A de estas organelas [53].

La habilidad de la mitocondria de acumular Ca^{2+} es grande pero no infinita. Cuando el límite es sobrepasado existe un colapso dramático del $\Delta\psi$, liberación del Ca^{2+} acumulado, hinchamiento de la matriz y ruptura de la membrana interna. Esto es la transición de permeabilidad mitocondria (TPM) [54].

Mediante la determinación de los solutos de más bajo peso molecular que continúan para proveer el soporte osmótico, ha sido posible determinar que aparece un poro en la membrana interna, el cual no es selectivamente permeable para solutos de hasta cerca de 1.5 kDa. Naturalmente la presencia de un poro semejante no es compatible con el mantenimiento del $\Delta\psi$ [55].

La primera sugerencia de que la TPM puede ser más que una ruptura inespecífica de la membrana vino con el descubrimiento de que el establecimiento de la TPM podía ser prevenido por el fármaco inmunosupresor ciclosporina A (CsA), que, casualmente, es

un inhibidor de la calcineurina fosfatasa dependiente de Ca^{2+} [56]. En este contexto, CsA se une a una proteína llamada ciclofilina D (CyP-D) localizada en la matriz mitocondrial. La CyP-D tiene la habilidad de catalizar la isomerización de los residuos de prolina en las proteínas y así puede tener un efecto profundo sobre la estructura proteica. Un número de observaciones implican al translocador de nucleótidos de adenina (ANT) en la TPM. Primero, la carga de Ca^{2+} requerida para inducir la transición es disminuida por atractilato, que estabiliza la conformación 'c' (citoplasmática) del translocador, pero es aumentada por el bongkretrato, que estabiliza la conformación 'm' (en la matriz) del ANT. En segundo lugar, la TPM es observada más fácilmente con mitocondrias aisladas incubadas en la ausencia de nucleótidos de adenina; por lo tanto, en presencia de concentraciones fisiológicas de ADP o ATP, se requieren altas cargas de Ca^{2+} total para inducir la transición. Se ha propuesto que el ANT y la CyP-D pueden formar un complejo que es prevenido por la CsA. Se encontró que una columna de afinidad con CyP-D ligado retenía al ANT; interesantemente, la porina de la membrana externa VDAC también estaba presente, y pudiendo ser un componente adicional del poro de transición de permeabilidad en sitios de contacto entre las membranas interna y externa [57].

El estrés oxidativo es el factor de inducción de la TPM más importante; por tanto el acetoacetato, que oxida el NADH en la mitocondria hepática, y el *t*-butil hidroperóxido, que oxida la GSH, facilitan la transición. Sin embargo, cuando la TPM ocurre con altas cargas de Ca^{2+} en la matriz, su inducción no parece correlacionarse directamente con el Ca^{2+} libre en la matriz, $[\text{Ca}^{2+}]_m$, ya que es potenciada por las concentraciones elevadas de fosfato, que deben disminuir la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ por formación del complejo de fosfato de calcio [58].

El desacoplamiento mitocondrial y el TPM pueden agotar el ATP, causando muerte celular por necrosis; o muerte celular por apoptosis cuando el agotamiento del ATP no es considerable [59].

PARTE EXPERIMENTAL

I. MATERIALES Y MÉTODOS

EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Espectrofotómetro UV/visible de arreglo de diodos (Beckman, DU 70)
- Espectrofotómetro de fluorescencia (Hitachi, F-4500)
- Fotómetro de luminiscencia (Perkin-Elmer, AutoLumat LB953)
- Homogenizador Potter-Elvehjem
- Centrífuga refrigerada (Hitachi, CF-15D2)
- Microcentrifuga refrigerada (Eppendorf, 5417R)
- Oxígrafo (Gilson Medical Electronics)

REACTIVOS

- Ratas albinas (*Ratus norvegicus*) cepa Wistar
- Sacarosa (Sigma-Aldrich)
- Ácido etilen glicol bis (-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA, Sigma-Aldrich)
- Ácido N-(2-hidroxiethyl) piperazin-N'-(2-etansulfónico) (HEPES, Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de potasio (Sigma-Aldrich)
- Tartrato de sodio y potasio (Sigma-Aldrich)
- Sulfato de cobre (Sigma-Aldrich)
- Carbonato de sodio (Sigma-Aldrich)
- Rotenona (Sigma-Aldrich)

- Rojo de rutenio (Sigma-Aldrich)
- Ciclosporina A (Sigma-Aldrich)
- Calcium Green 5 N (Molecular Probes)
- Safranina O (Sigma-Aldrich)
- Sal monopotásica de adenosin 5'-difosfato (ADP, Sigma-Aldrich)
- Succinato de potasio (Sigma-Aldrich)
- Kit de ensayo de luciferina-luciferasa (Sigma-Aldrich)
- Cloruro de magnesio (Sigma-Aldrich)
- Cloruro de calcio (Sigma-Aldrich)
- Tolueno (Labsynth)
- Xileno (Mallinckrodt)
- Ácido perclórico (Sigma-Aldrich)
- Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich)

Métodos

Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata.

Las mitocondrias se aislaron por centrifugación diferencial de acuerdo al método de Pedersen [60]. El precipitado mitocondrial final fue resuspendido en 1 ml de medio que contenía sacarosa 250 mM y HEPES-KOH 10mM, pH 7.2, y utilizado durante las siguientes 3 horas. El contenido de proteínas mitocondriales fue determinado espectrofotométricamente mediante la reacción del biuret.

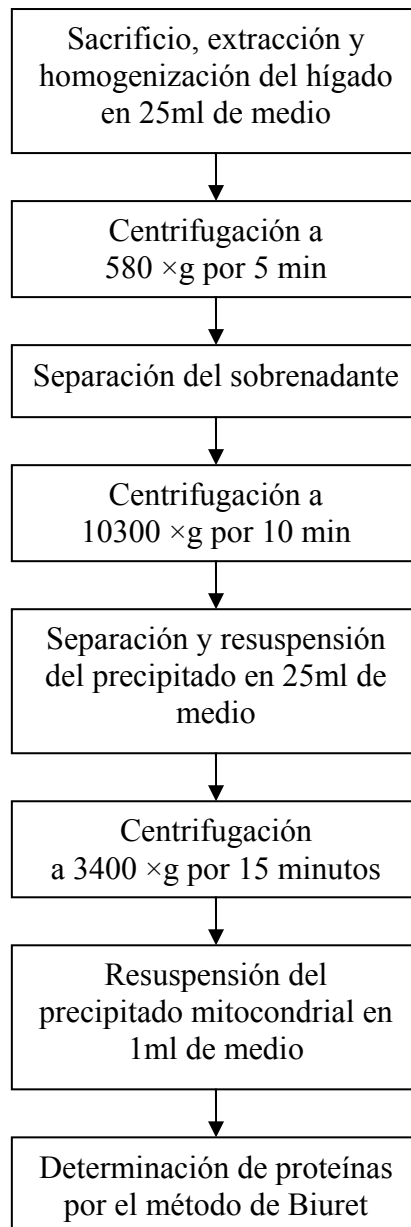


Diagrama 1. Pasos para el aislamiento de mitocondrias de hígado de rata.

Medio de incubación

Las mitocondrias energizadas con succinato de potasio 5 mM (más rotenona 2.5 μ M) en un medio de incubación estándar conteniendo sacarosa 125 mM, KCl 65 mM y HEPES-KOH 10 mM, pH 7.4, fueron incubadas a 30°C.

Soluciones de tolueno y xileno

Se prepararon soluciones stock de tolueno y xileno 0.1, 0.5 y 2 M en dimetilsulfóxido de las cuales se adicionaron con micropipetas al inicio de cada ensayo los volúmenes necesarios para obtener concentraciones de tolueno y xileno 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 y 5 mM en las celdas conteniendo el medio de incubación con las mitocondrias aisladas. Para los controles negativos se añadieron sobre los medios de incubación volúmenes de dimetilsulfóxido iguales a los volúmenes de las soluciones stock añadidas en cada ensayo.

Monitoreo de la respiración mitocondrial (consumo de oxígeno)

La respiración mitocondrial fue monitoreada polarográficamente mediante un oxígrafo equipado con un electrodo para oxígeno tipo Clark (Gilson Medical Electronics, Middleton, WI, EEUU).

La respiración de las mitocondrias aisladas se evaluó a través del cálculo de la relación ADP/oxígeno y de la Razón de Control Respiratorio (RCR) que miden el grado de acoplamiento de la mitocondria. La relación ADP/O se halló dividiendo la cantidad de ADP colocado en la cámara del oxígrafo entre la cantidad de oxígeno necesario para consumir este ADP. La RCR se calculó dividiendo la velocidad de consumo de oxígeno durante la síntesis de ATP (estado III) entre la velocidad de consumo de oxígeno tras el

agotamiento del ADP (estado IV). La RCR de las mitocondrias con que se realizaron los ensayos se encontró siempre en el rango de 4.5 a 6.0.

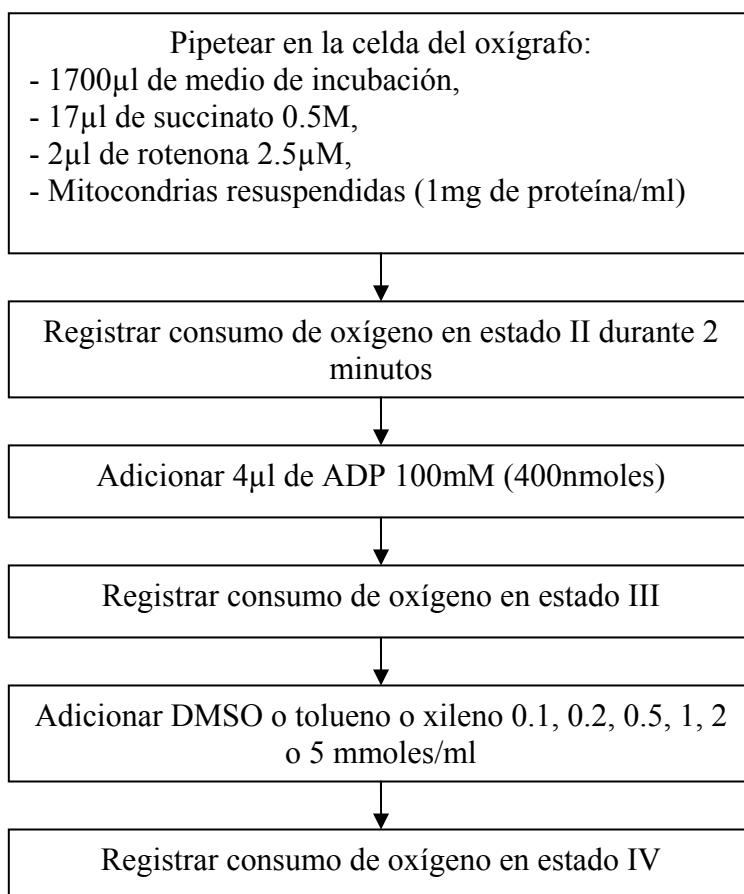


Diagrama 2. Pasos para el monitoreo de la respiración mitocondrial.

Monitoreo del potencial de la membrana mitocondrial interna

El potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) se determinó espectrofluorimétricamente utilizando safranina O 10 µM como sonda [61] y un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi modelo F-4500 (Tokio, Japón) en el par de longitudes de onda de excitación/emisión 495/586 nm; estos ensayos fueron realizados en presencia de EGTA 0.5 mM y K_2HPO_4 10 mM.

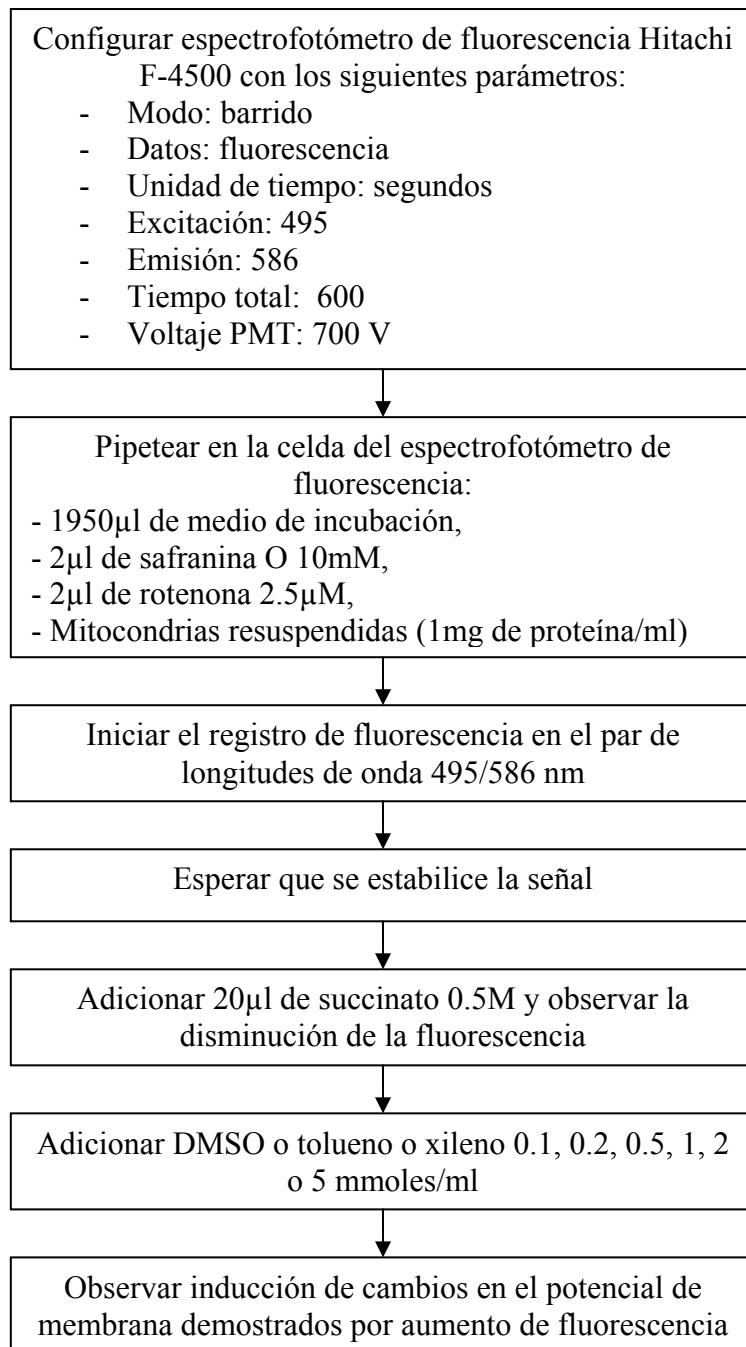


Diagrama 3. Pasos para el monitoreo del potencial de la membrana mitocondrial interna.

Estimación de la liberación de Ca²⁺

La liberación de Ca²⁺ por las mitocondrias aisladas fue evaluada espectrofluorimétricamente utilizando Calcium Green 5N (Molecular Probes, OR, EEUU) 150 nM como sonda, monitoreada en el par de longitudes de onda de excitación/emisión 506/531 nm [62].

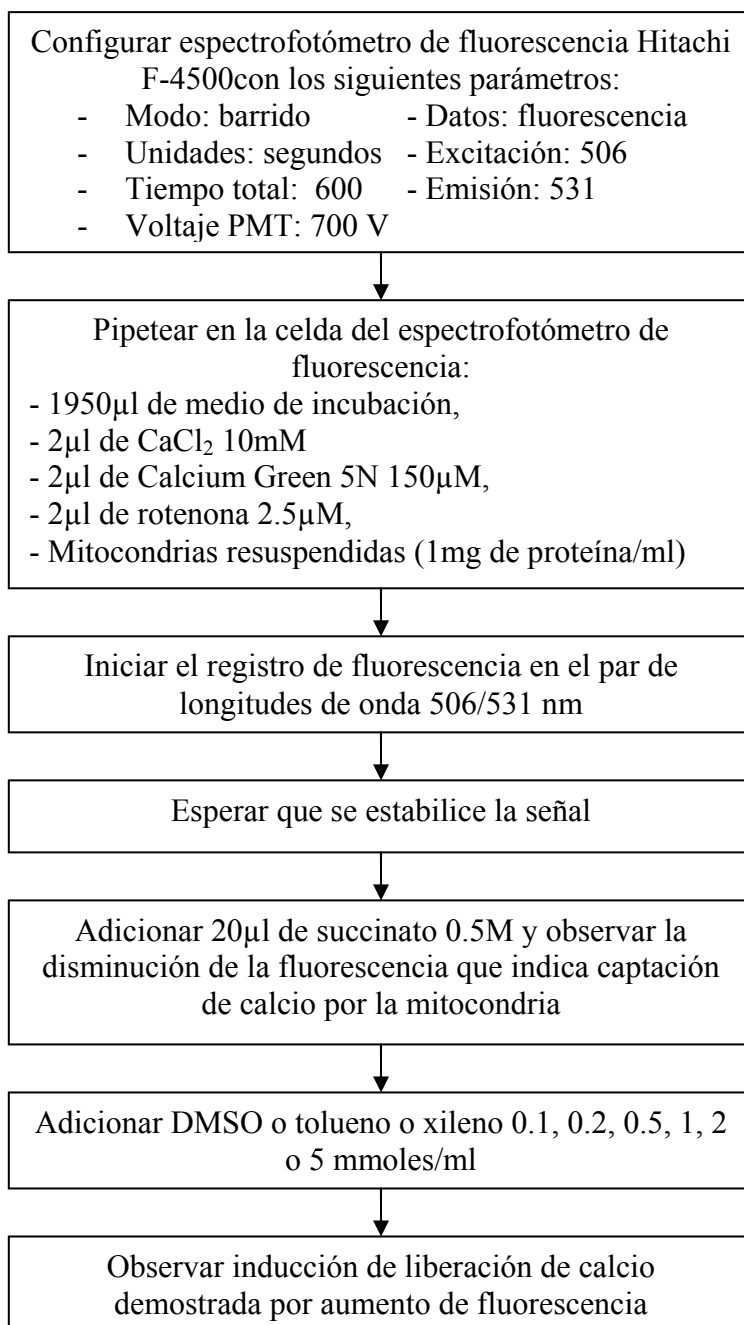


Diagrama 4. Pasos para el monitoreo de la liberación de calcio de mitocondrias aisladas.

Monitoreo de la formación de H₂O₂

La generación de H₂O₂ se analizó utilizando ácido homovanílico/peroxidasa de rábano 12UI/ml en el par de longitudes de onda de excitación/emisión 312/420 nm [63].

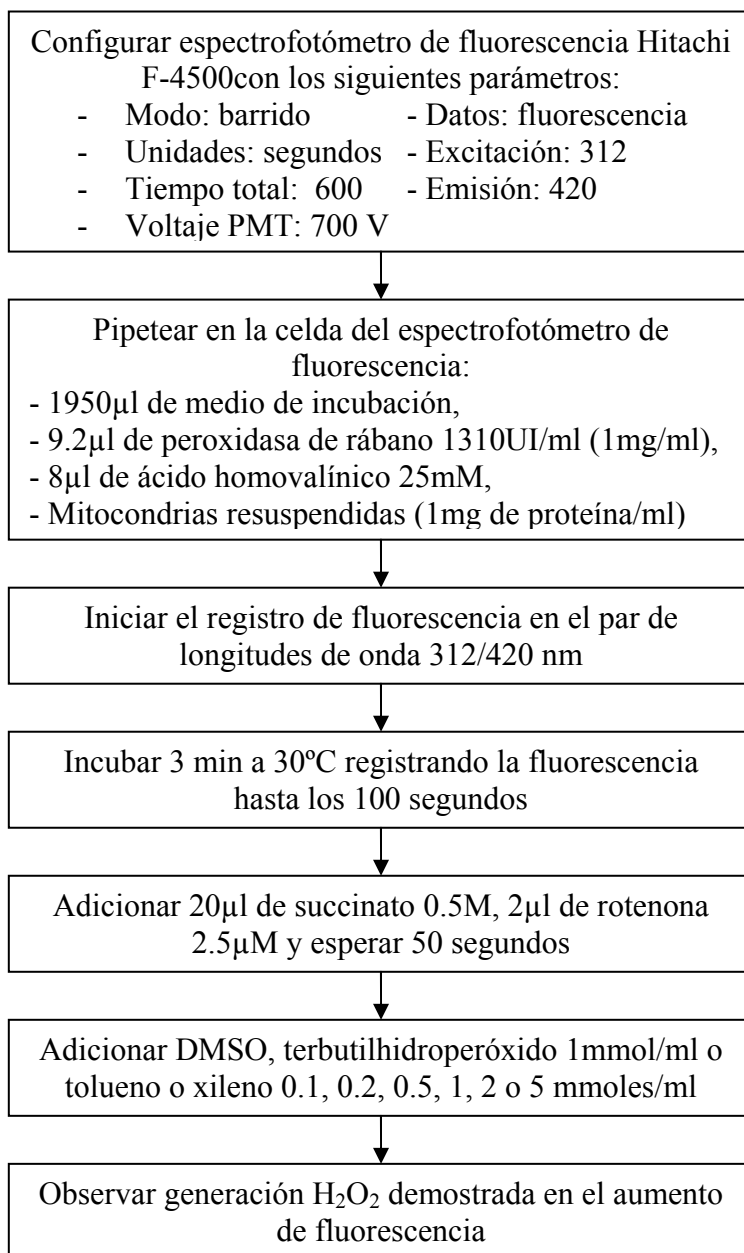


Diagrama 5. Pasos para el monitoreo de la formación de H₂O₂ en mitocondrias aisladas.

Estimación del hinchamiento mitocondrial

El hinchamiento mitocondrial se estimó mediante la disminución de la absorbancia aparente a 540 nm, utilizando un espectrofotómetro Beckman modelo DU-70 (EEUU).

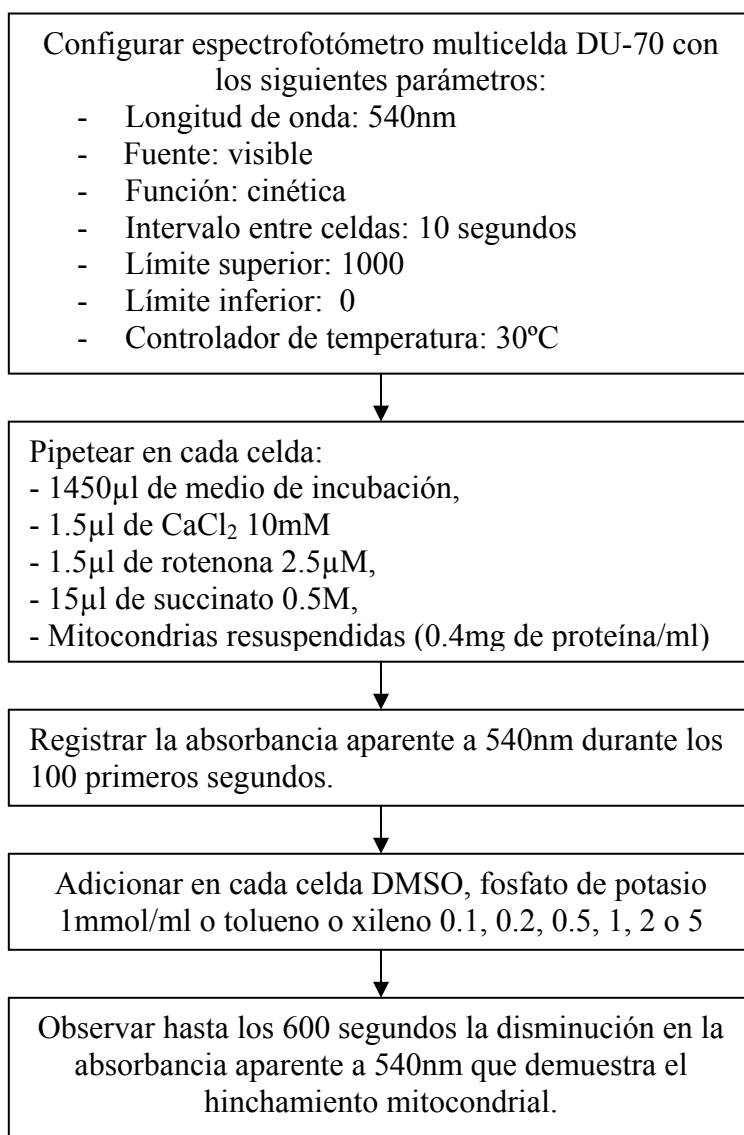
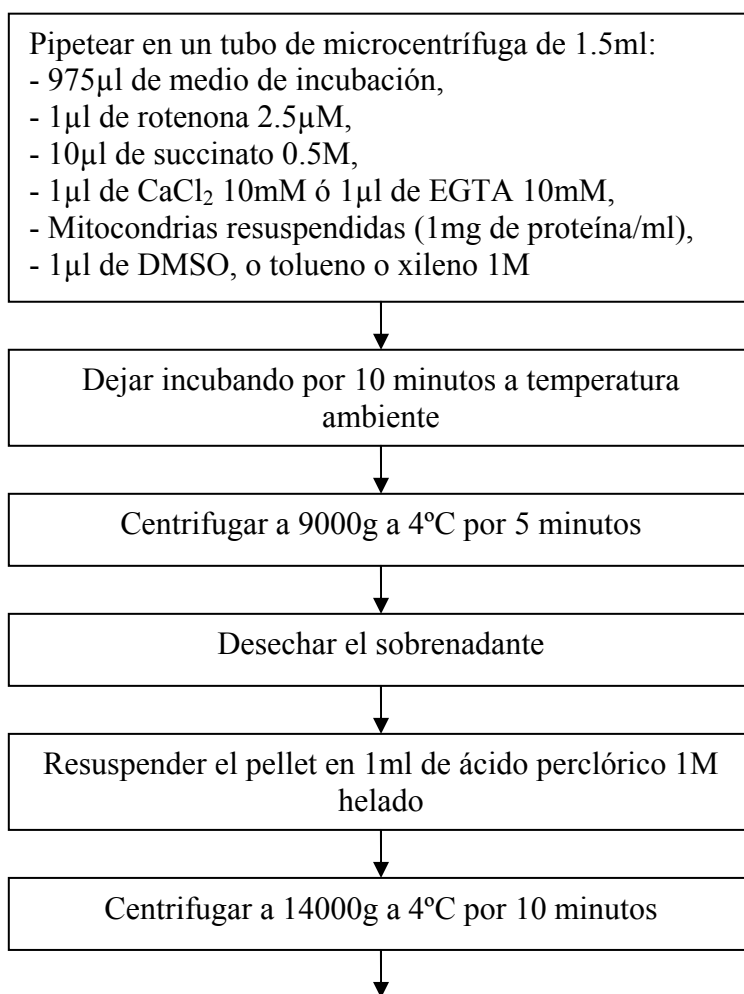


Diagrama 6. Pasos para la estimación del hinchamiento mitocondrial.

Determinación de ATP

El ATP se determinó mediante el sistema de ensayo de luciferina-luciferasa de luciérnaga [64]. La suspensión de mitocondrias (1 mg de proteína/ml) se centrifugó a $9000\times g$ durante 5 min a 4°C y el precipitado fue tratado con 1ml de HClO_4 1M helado (4°C). Después de centrifugar a $14000\times g$ durante 5 minutos a 4°C , se neutralizaron alícuotas de 100 μl de los sobrenadantes con 70 μl de KOH 2M en solución de TRIS-HCl 100 mM, pH 7.8 (volumen final, 1 ml), y se centrifugaron a $15000\times g$ durante 15 min. Se midió la bioluminiscencia en el sobrenadante con un kit de ensayo de Sigma/Aldrich, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, utilizando un fotómetro de luminiscencia AutoLumat modelo LB953 (Perkin-Elmer Life Sciences, Wilbad, Alemania).



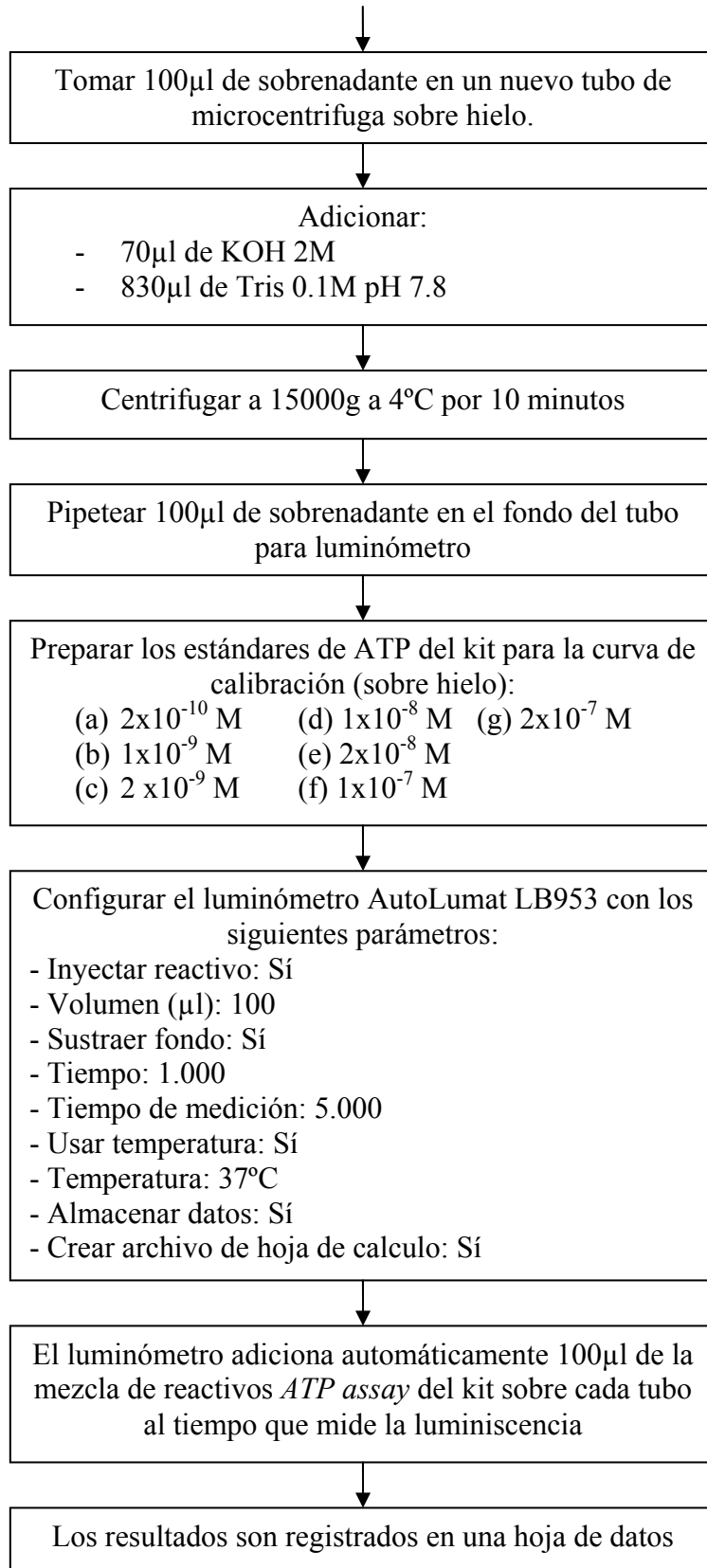


Diagrama 7. Pasos para la determinación de ATP sintetizado en mitocondrias aisladas.

II. RESULTADOS

Efectos de tolueno y xileno sobre procesos asociados a energía en mitocondrias de hígado de rata: respiración, potencial de membrana y liberación de Ca^{2+}

Las figuras 2 y 3 muestran los efectos de tolueno y xileno, respectivamente, sobre las velocidades de fosforilación de estado 3 y basal (estado 4) de la respiración de mitocondrias incubadas con el sustrato respiratorio del sitio II succinato (+ rotenona), seguido de la adición de ADP, que inicia la respiración de estado 3. Después de haber sido consumido todo el ADP en la síntesis de ATP, la respiración es conducida al estado 4. La exposición de las mitocondrias aisladas a tolueno 0.5-2.5 mM o xileno 0.25-1 mM aumentó la velocidad de respiración del estado 4, indicando que los solventes desacoplaron en la mitocondria el transporte de electrones de la fosforilación oxidativa, actuando xileno más efectivamente que tolueno. Tolueno y xileno a concentraciones de 5 y 2.5 mM, respectivamente, causaron una fuerte inhibición tanto de la respiración de estado 3 como de estado 4, indicando una pérdida completa de la función mitocondrial asociada con energía evocada por los solventes.

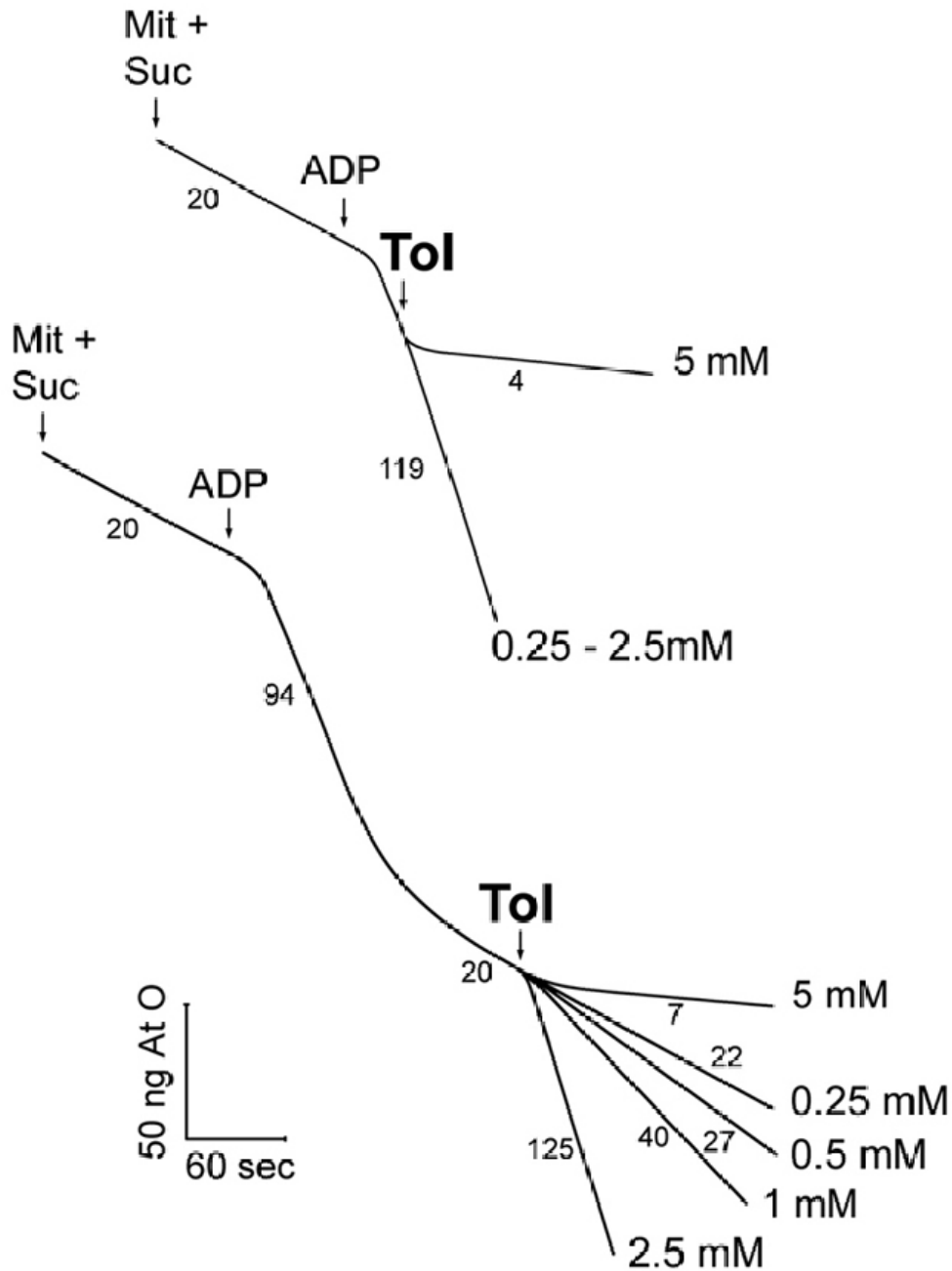


Figura 2. Efectos de tolueno sobre la velocidad de respiración de estado 3 y estado 4 de mitocondrias aisladas de hígado de rata energizadas con succinato. Las mitocondrias (Mit, 1.5 mg de proteínas) fueron incubadas a 30°C con succinato 5 mM + rotenona 2.5 μ M (Suc) en un medio estándar conteniendo sacarosa 125 mM, KCl 65 mM y HEPES-KOH 10 mM, pH 7.4, en presencia de EGTA 0.5 mM y K_2PO_4 , en un volumen final de 1.5 ml; la respiración de estado 3 se inició con 0.4 μ moles de ADP. Los trazos son representativos de tres experimentos con distintas preparaciones mitocondriales. Los números son velocidades de respiración dadas como ng de átomos de O/min.

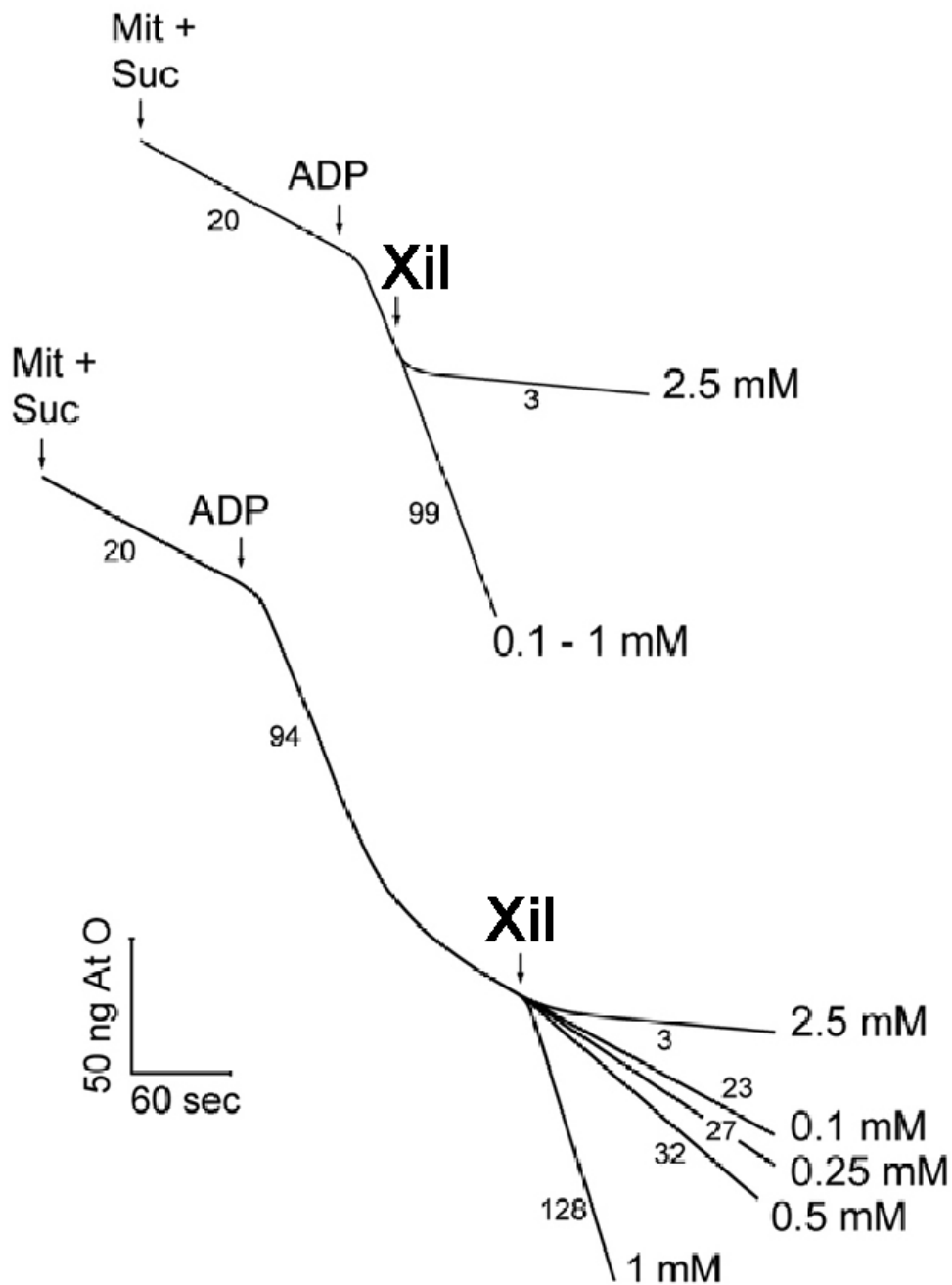


Figura 3. Efectos de xileno sobre la velocidad de respiración de estado 3 y estado 4 de mitocondrias aisladas de hígado de rata energizadas con succinato. Las mitocondrias (Mit, 1.5 mg de proteínas) fueron incubadas a 30°C con succinato 5 mM + rotenona 2.5 μ M (Suc) en un medio estándar conteniendo sacarosa 125 mM, KCl 65 mM y HEPES-KOH 10 mM, pH 7.4, en presencia de EGTA 0.5 mM y K_2PO_4 , en un volumen final de 1.5 ml; la respiración de estado 3 se inició con 0.4 μ moles de ADP. Los trazos son representativos de tres experimentos con distintas preparaciones mitocondriales. Los números son velocidades de respiración dadas como ng de átomos de O/min.

La figura 4 muestra cómo tolueno 2.5 mM y xileno 1 mM disiparon fuertemente el $\Delta\psi$ ocasionado por la provisión de energía del succinato a la mitocondria.

La figura 5 muestra los efectos de tolueno y xileno sobre la liberación de Ca^{2+} por la mitocondria preincubada con este catión en concentración 10 μM . La energización de la mitocondria con succinato le permitió capturar Ca^{2+} , que fue retenido por lo menos durante 5 minutos. Después de la captación, se examinaron los efectos de la adición de concentraciones crecientes de tolueno y xileno. La liberación observada del Ca^{2+} acumulado en las mitocondrias fue paralela a la estimulación de la respiración de estado 4, sugiriendo una relación íntima entre estos efectos.

Efectos de tolueno y xileno sobre la generación de EROs y el hinchamiento mitocondrial

La figura 6 muestra los efectos de tolueno y xileno sobre la generación mitocondrial de EROs: Tolueno, a concentraciones de hasta 5 mM, no causó tal efecto; en contraste xileno, desde la concentración 0.1 mM, fue significativamente efectivo en ese sentido; la generación de EROs por xileno 1 mM fue mayor que la ocasionada por el *t*-butil hidroperóxido, un inductor clásico de estrés oxidativo, usado en la misma concentración. Sólo xileno indujo un significativo hinchamiento mitocondrial, observándose una relación estrecha entre este efecto y la habilidad para generar EROs. El hinchamiento mitocondrial usualmente refleja la inducción de un proceso de transición de permeabilidad la membrana (TPM) mitocondrial dependiente de Ca^{2+} , y sensible a CsA y a NEM. No obstante, es importante apreciar que aquí el hinchamiento inducido por xileno, así como el ligero proceso similar inducido por tolueno, fue sólo

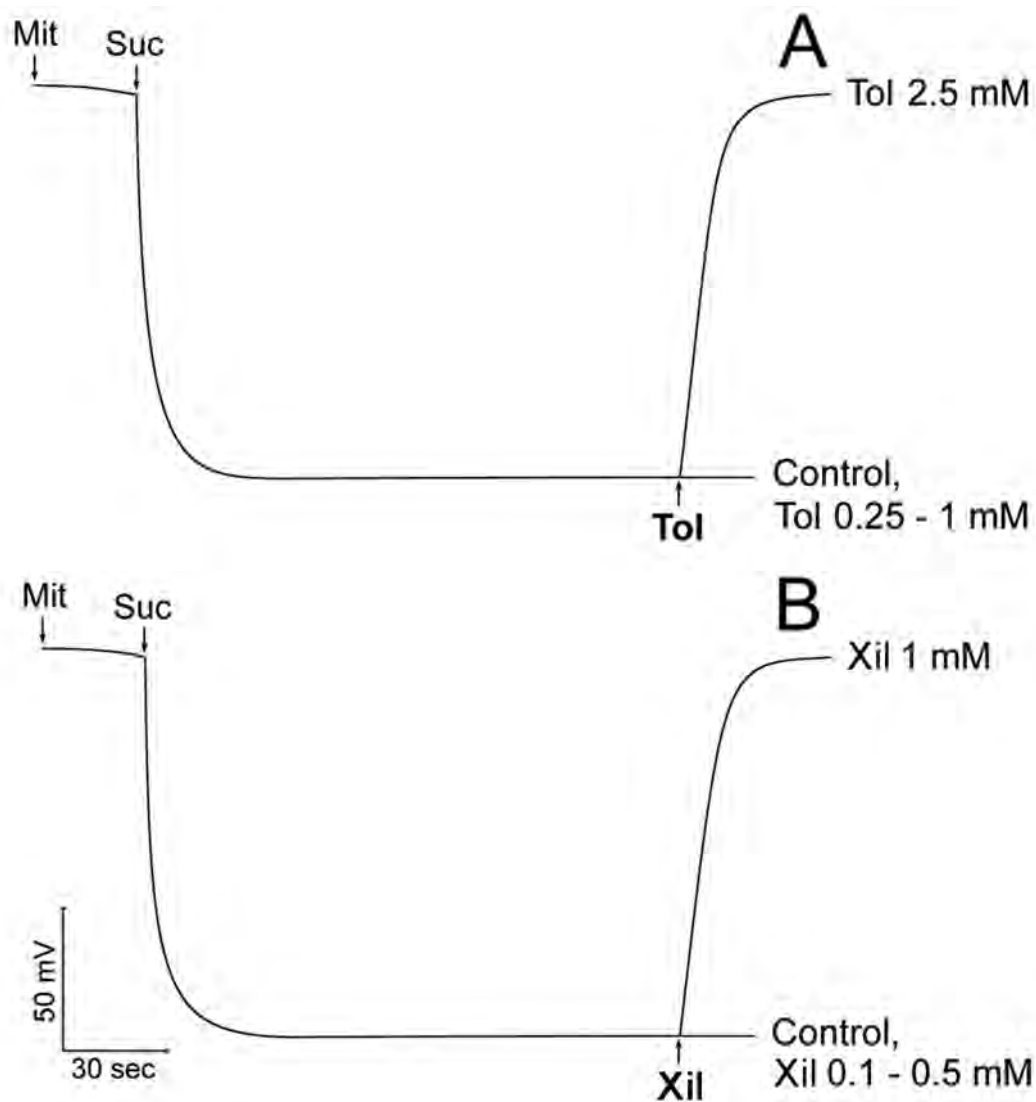


Figura 4. Efectos de tolueno (A) y xileno (B) sobre el potencial de membrana de mitocondrias aisladas de hígado de rata energetizadas con succinato. Las mitocondrias (Mit, 2 mg de proteína) incubadas en un medio estándar conteniendo sacarosa 125 mM, KCl 65 mM y HEPES-KOH 10 mM, pH 7.4, más rotenona 2.5 μ M y safranina O 10 μ M, en un volumen final de 2 ml, fueron energetizadas por la adición de succinato 5 mM (Suc), estableciéndose un potencial de membrana mitocondrial. Los trazos son representativos de tres experimentos con distintas preparaciones mitocondriales.

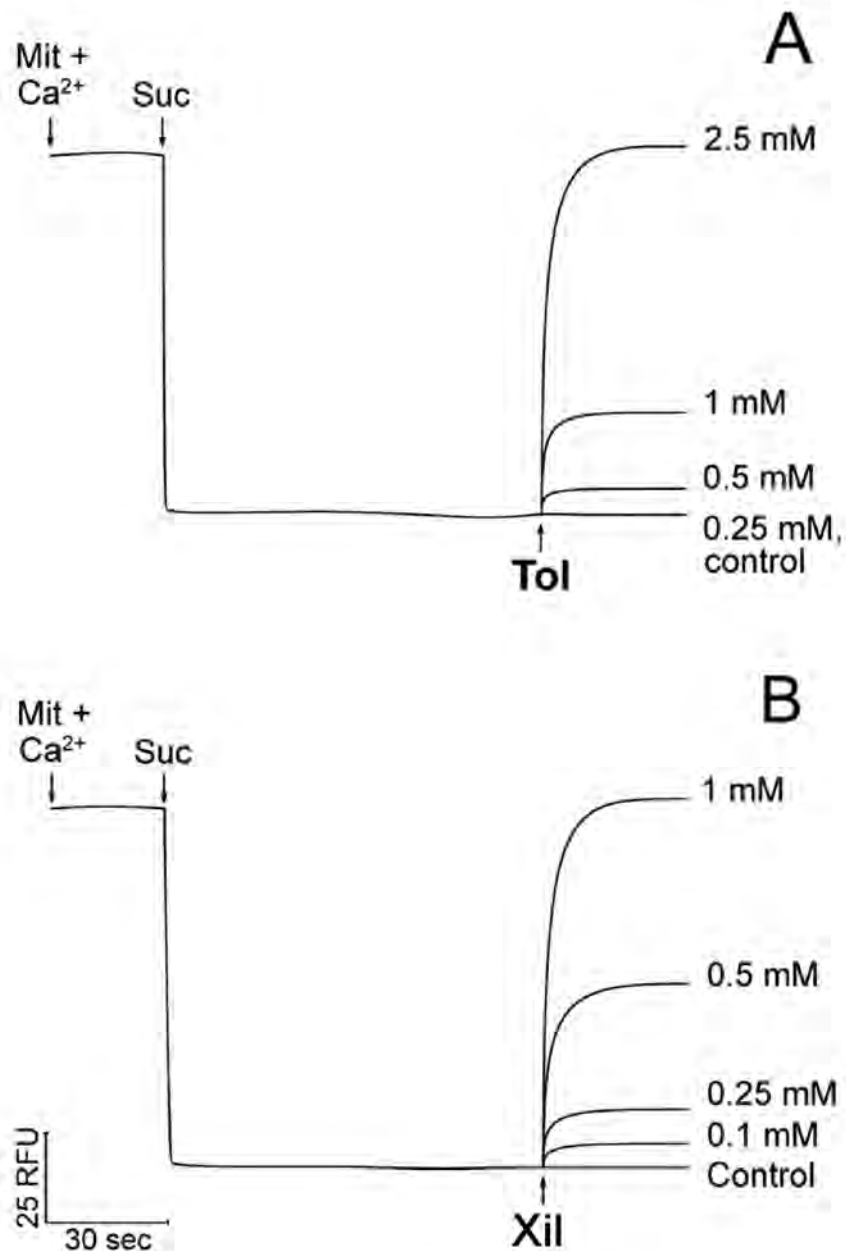


Figura 5. Efectos de tolueno (A) y xileno (B) sobre el eflujo mitocondrial de Ca^{2+} en mitocondrias aisladas de hígado de rata energizadas con succinato. Las mitocondrias (Mit, 1 mg de proteína) incubadas en el medio estándar conteniendo sacarosa 125 mM, KCl 65 mM y HEPES-KOH 10 mM, pH 7.4, más rotenona 2.5 μM , CaCl_2 10 μM y Calcium Green 5N 150 nM, en un volumen final de 2 ml, fueron energizadas por la adición de succinato 18.75 mM (Suc), permitiendo a las organelas captar Ca^{2+} . RFU, unidades relativas de fluorescencia. Los trazos son representativos de tres experimentos con distintas preparaciones mitocondriales.

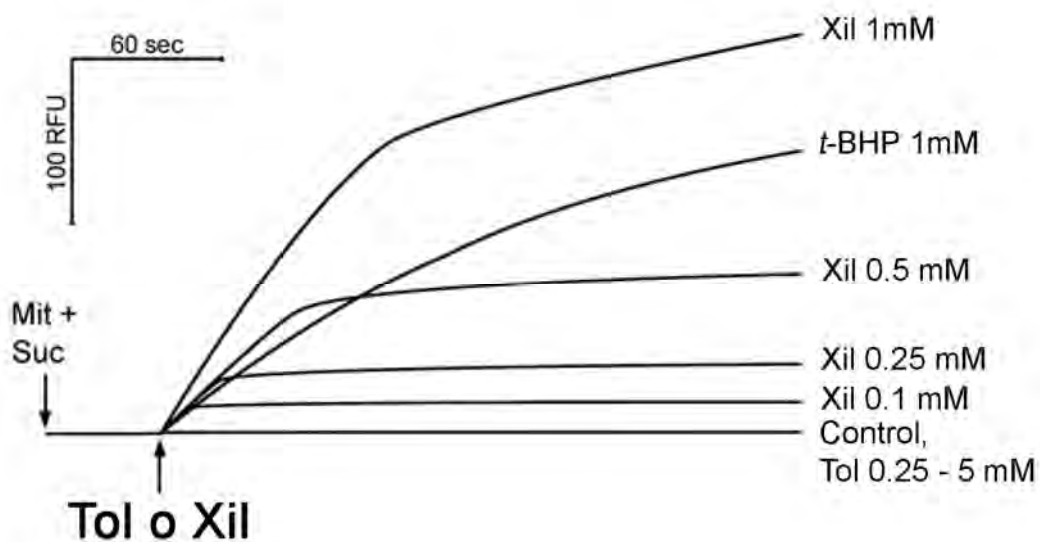


Figura 6. Efectos de tolueno (Tol) y xileno (Xil) en la acumulación de H_2O_2 en mitocondrias aisladas de hígado de rata energetizadas con succinato. Las mitocondrias (Mit, 1 mg de proteína) fueron incubadas en el medio estándar conteniendo sacarosa 125 mM, KCl 65 mM y HEPES-KOH 10mM, pH 7.4, con succinato 5 mM + rotenona μ M (Suc) más ácido homovanílico 0.1 mM y 12 UI/ml de peroxidasa de rábano picante, en un volumen final de 2 ml. RFU, unidades relativas de fluorescencia. Los trazos son representativos de tres experimentos con distintas preparaciones mitocondriales. Se presenta el trazo de *t*-BHP (*tert*-butil hidroperóxido) para comparación.

parcialmente inhibido por CsA, por el quelante de Ca^{2+} , EGTA, o por el reactivo tiólico, NEM (figuras 7 y 8). EGTA y NEM inhibieron casi completamente el hinchamiento mitocondrial inducido por xileno al ser utilizados en simultáneo.

Efecto de tolueno y xileno sobre los niveles mitocondriales de ATP

Las figuras 9 y 10 muestran los efectos sobre el ATP de mitocondrias expuestas a tolueno o xileno. En ausencia de Ca^{2+} (presencia de EGTA 100 μM), tolueno o xileno 1 mM disminuyeron los niveles de ATP a 66.3 y 40.3%, respectivamente; en presencia de Ca^{2+} (ausencia de EGTA), los solventes disminuyeron los niveles de ATP a 59.4 y 30.3%, respectivamente.

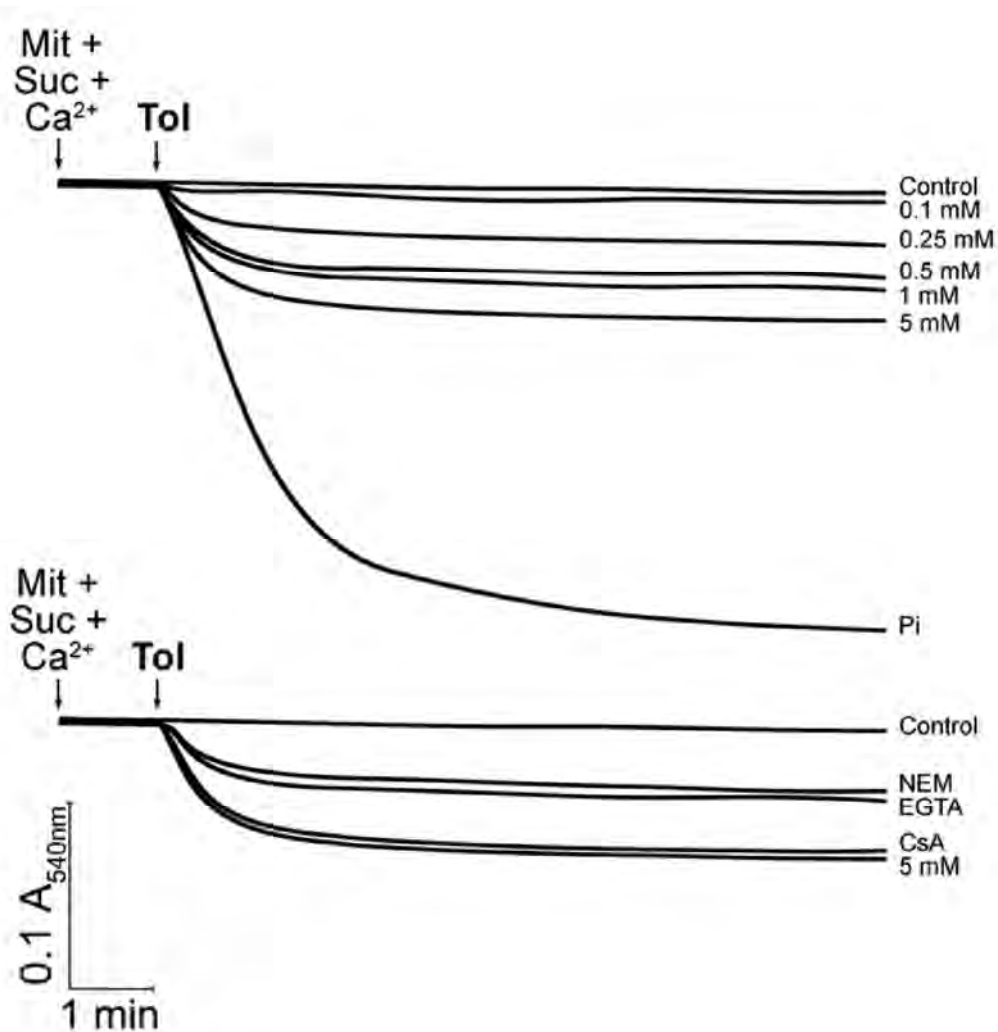


Figura 7. Capacidad de tolueno (Tol) de ocasionar hinchamiento en mitocondrias aisladas de hígado de rata; efecto de preincubaciones con EGTA 0.1 mM, ciclosporina A (CsA) 1 μ M y N-etilmaleimida (NEM) 25 μ M. Las mitocondrias (Mit, 0.4 mg de proteína) fueron incubadas en medio estándar conteniendo sacarosa 125 mM, KCl 65 mM y HEPES-KOH 10mM, pH 7.4, con succinato 5 mM + rotenona μ M (Suc) más CaCl₂ 10 μ M (Ca²⁺), en un volumen final de 1 ml. Los trazos son representativos de tres experimentos con distintas preparaciones mitocondriales. Se presenta el trazo de Pi (fosfato inorgánico 1 mM), un inductor clásico de TPM, para comparación.

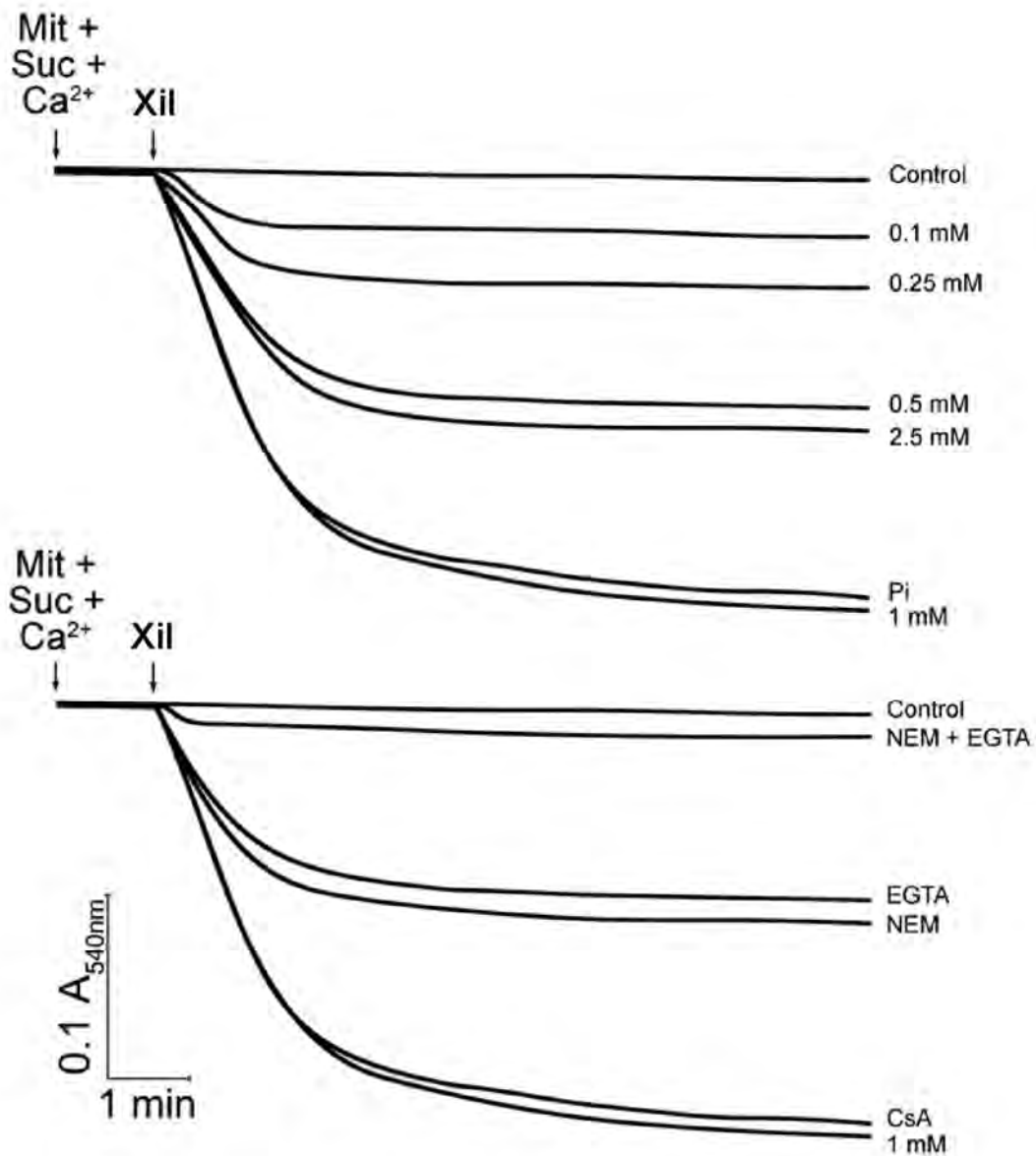


Figura 8. Capacidad de xileno (Xil) de ocasionar hinchamiento en mitocondrias aisladas de hígado de rata; efecto de preincubaciones con EGTA 0.1 mM, ciclosporina A (CsA) 1 μ M y N-etilmaleimida (NEM) 25 μ M. Las mitocondrias (Mit, 0.4 mg de proteína) fueron incubadas en medio estándar conteniendo sacarosa 125 mM, KCl 65 mM y HEPES-KOH 10mM, pH 7.4, con succinato 5 mM + rotenona μ M (Suc) más CaCl₂ 10 μ M (Ca²⁺), en un volumen final de 1 ml. Los trazos son representativos de tres experimentos con distintas preparaciones mitocondriales. Se presenta el trazo de Pi (fosfato inorgánico 1 mM), un inductor clásico de TPM, para comparación.

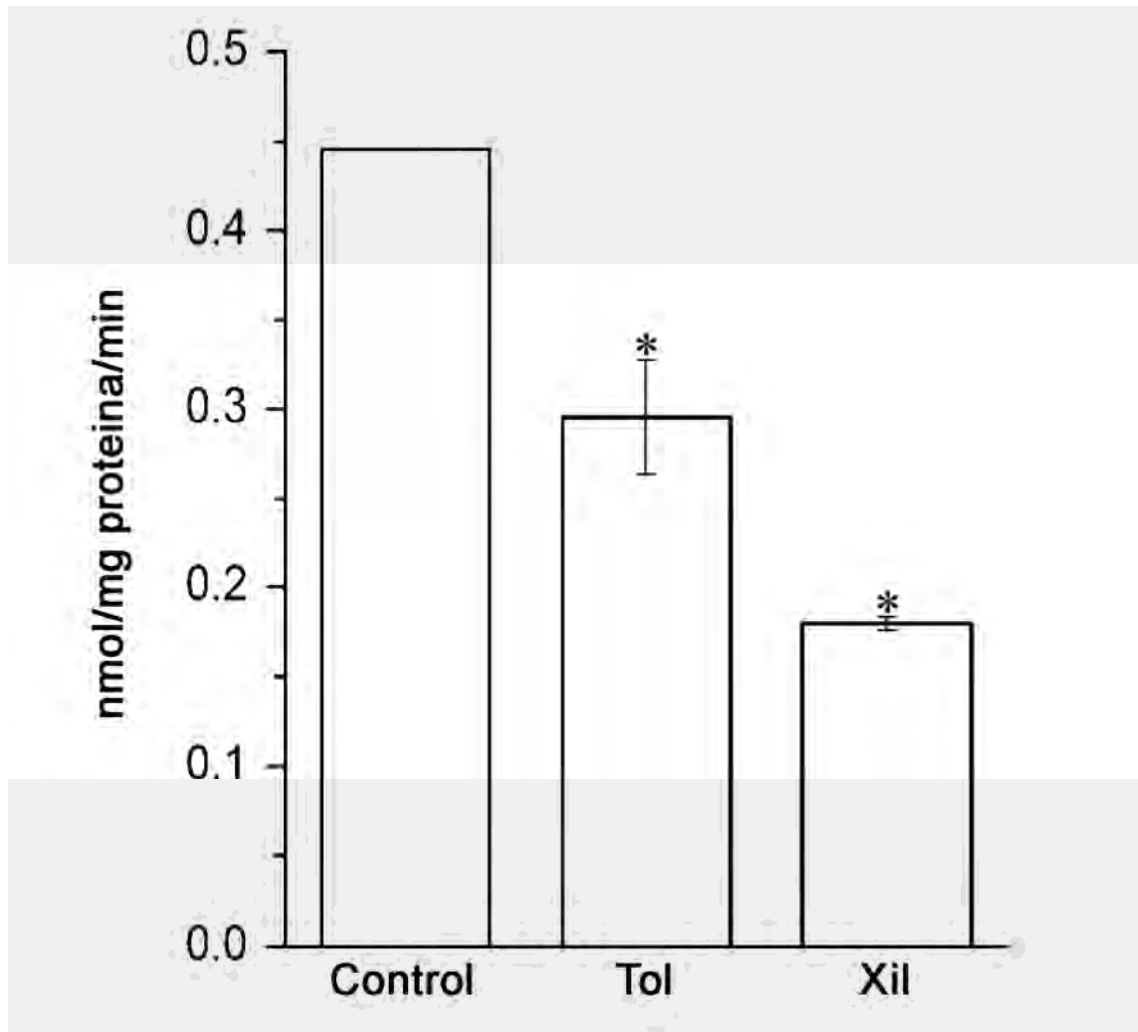


Figura 9. Efectos de tolueno 1mM (Tol) y xileno 1 mM (Xil) sobre los niveles de ATP de mitocondrias aisladas de hígado de rata energetizadas con succinato después de 10 minutos de incubación en el medio estándar conteniendo sacarosa 125 mM, KCl 65 mM y HEPES-KOH 10mM, pH 7.4, con succinato 5 mM + rotenona μ M (Suc). El medio estándar contuvo EGTA 100 μ M. La gráfica muestra la media y desviación estándar de tres experimentos distintos. *Significantemente diferente del control ($p < 0.001$). Los datos fueron analizados por ANOVA unilateral seguido de la prueba *t* de Dunnett.

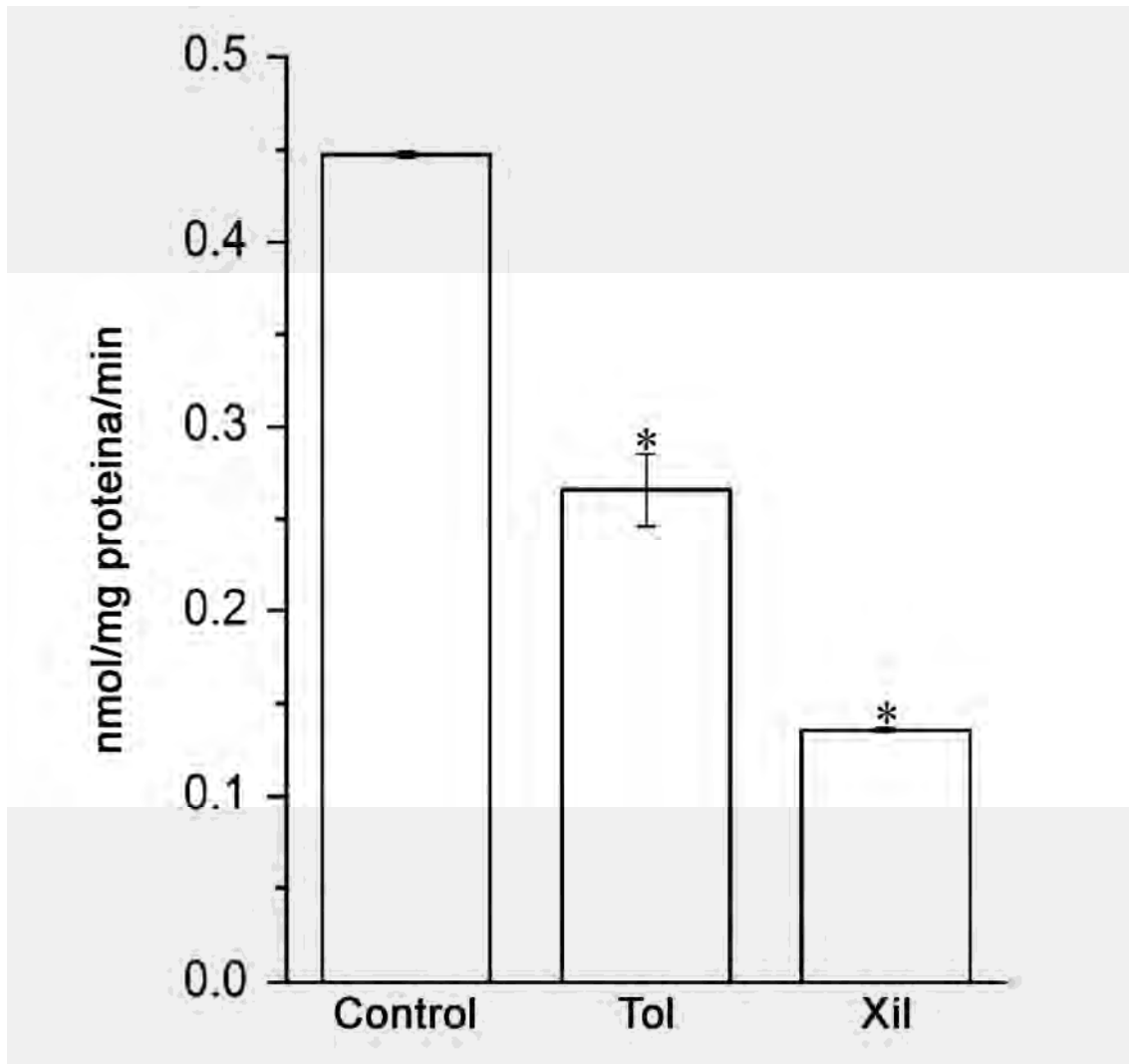


Figura 10. Efectos de tolueno 1mM (Tol) y xileno 1 mM (Xil) sobre los niveles de ATP de mitocondrias aisladas de hígado de rata energizadas con succinato después de 10 minutos de incubación en el medio estándar conteniendo sacarosa 125 mM, KCl 65 mM y HEPES-KOH 10mM, pH 7.4, con succinato 5 mM + rotenona μ M (Suc). El medio estándar contuvo CaCl_2 10 μ M. La gráfica muestra la media y desviación estándar de tres experimentos distintos. *Significativamente diferente del control ($p < 0.001$). Los datos fueron analizados por ANOVA unilateral seguido de la prueba *t* de Dunnett.

III. DISCUSIÓN

En el presente trabajo tolueno y xileno estimularon las velocidades de respiración de estado 4, disiparon el $\Delta\psi$ y liberaron Ca^{2+} de las organelas, acciones consistentes con un efecto desacoplador, conduciendo a la depleción del ATP mitocondrial. Dicho desacoplamiento tiene el potencial de poner en peligro funciones vitales de la célula, en especial en órganos que muestran una alta demanda de energía como el cerebro y el hígado, los principales blancos toxicológicos de tolueno y xileno en humanos y otros vertebrados [25,65-67].

Xileno mostró ser un agente desacoplador más efectivo que tolueno y como tal, también más efectivo en la depleción del ATP mitocondrial. Mientras el desacoplamiento es un efecto íntimamente dependiente de la función mitocondrial, creemos que la inhibición completa de la respiración mitocondrial observada cuando se utilizaron concentraciones relativamente altas de tolueno o xileno, refleja una completa pérdida de la función mitocondrial vinculada a energía debida a acciones inespecíficas de los solventes sobre componentes de la membrana mitocondrial interna.

La estructura molecular de tolueno y xileno hace parecer improbable que un mecanismo protonoforético, que implica el paso de protones a través de la membrana mitocondrial interna, dé cuenta de sus propiedades desacopladoras. Ya que estos solventes son hidrocarburos aromáticos, sin grupos liberadores de protones, la acción por la cual desacoplan mitocondrias indica en su lugar una habilidad para interferir con las bombas de protones por su unión a sitios hidrofóbicos específicos de la membrana, más

probablemente proteínas, cambiando sus conformaciones y consecuentemente sus cinéticas internas. Una eventual perturbación de la fase lipídica de la membrana mitocondrial por tolueno o xileno parece improbable, ya que cuando evaluamos esta posibilidad con la sonda molecular fluorescente 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), no pudimos detectar interacción significativa de estos solventes con la región hidrofóbica de la bicapa lipídica.

Se sabe que la inhibición de la cadena respiratoria usualmente aumenta la generación de EROs por la mitocondria [68,69]. Específicamente, se ha propuesto a la cadena respiratoria como una fuente común de oxidantes inducibles cuando la membrana mitocondrial es dañada por su exposición a la mayoría de solventes; tolueno en particular, ha sido considerado como capaz de causar desarreglos en la membrana seguidos por la producción de superóxido [70]. A las concentraciones empleadas, en las que tolueno y xileno causaron desacoplamiento, pero no inhibición de la respiración, sólo xileno mostró la habilidad de aumentar la producción de EROs por las mitocondrias, un efecto que podría resultar del mismo tipo de interacción que conduce al desacoplamiento, es decir, uniéndose a sitios hidrofóbicos específicos al interior de la membrana interna mitocondrial.

Es notable que a pesar de las diferencias descritas, tolueno y xileno presentan sólo pequeña diferencia en su estructura química, así que creemos que ellas pueden explicarse por sus distintos coeficientes de partición aceite/agua ($\text{Log } K_{ow}$), el $\text{Log } K_{ow}$ mayor de xileno (3.16) en relación al de tolueno (2.17) [71,72], aumentando su flujo y/o su interacción con los diana de la membrana mitocondrial.

En presencia de Ca^{2+} , en condiciones que usualmente involucran la producción de EROs, la mitocondria aislada puede experimentar un proceso de transición de permeabilidad (TPM), mediada por la abertura de poros de transición de permeabilidad (PTP) de membrana, y vinculados con la oxidación de grupos tiólicos de proteínas, demostrados por el hinchamiento mitocondrial sensible a CsA [53, 58]. Xileno, pero no tolueno, ocasionó un hinchamiento mitocondrial significativo, en asociación aparente con la generación mitocondrial de EROs. Sin embargo, la evidencia de que dicho hinchamiento solo fue parcialmente inhibido por el agente quelante de Ca^{2+} EGTA, por el reactivo tiólico monofuncional NEM, o por el inhibidor específico ciclosporina A, sugiere que encaja sólo parcialmente con las características del proceso clásico de TPM. El hallazgo de que la presencia de Ca^{2+} no condujo a un aumento sustancial en la depleción de ATP por xileno indica que el proceso de TPM puede no ser muy relevante para la toxicidad de este compuesto en las mitocondrias.

Así, el desacoplamiento mitocondrial parece ser el principal factor responsable de la depleción de ATP, explicando potencialmente la toxicidad de xileno, y en una menor magnitud la de tolueno, observadas en diferentes tipos celulares expuestos a estos solventes, y posiblemente del mismo modo en sujetos humanos.

IV. CONCLUSIONES

- 1) Tolueno y xileno son compuestos químicos capaces de alterar el estado energético en las mitocondrias al ocasionar depleción del ATP por desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones.

- 2) Se demuestra también que xileno es capaz de alterar el estado oxidativo de las células al aumentar la generación de EROs en la mitocondria asociada a la formación de PTPs de la membrana mitocondrial.

- 3) Tolueno y xileno son compuestos potencialmente tóxicos para las células eucarióticas, especialmente en aquellos tejidos con alta demanda de energía bajo la forma de ATP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hazardous Substances Data Bank. Xylene. Bethesda (MD): National Library of Medicine; 2005.
- [2] Antos GJ, Aitani AM. Catalytic naphtha reforming. New York: Marcel Dekker; 2004.
- [3] Flick EW. Industrial solvents handbook. Norwich (NY): William Andrew Publishing; 1998.
- [4] Wypych G. Handbook of solvents. Norwich (NY): Chem Tec Publishing; 2001.
- [5] Cheremisinoff NP. Industrial solvents handbook. New York: Marcel Dekker; 2003.
- [6] ATSDR. Toxicological profile for toluene. Atlanta (GA): U.S. Department for Health and Human Services; 2000.
- [7] ATSDR. Draft toxicological profile for xylene. Atlanta (GA): U.S. Department for Health and Human Services; 2005.
- [8] Timbrell J. Principles of Biochemical Toxicology. Philadelphia (PA): Taylor & Francis; 2000.
- [9] Hodgson E, Smart RC. Introduction to Biochemical Toxicology. New York: John Wiley and Sons; 2001.
- [10] Arlien-Soborg P. Solvent Neurotoxicity. Boca Raton: RC Press; 1992.
- [11] Dinwiddie SH. Abuse of inhalants: a review. *Addiction* 1994; 89 925–939.
- [12] Neumark YD, Delva J, Anthony JC. The epidemiology of adolescent inhalant drug involvement. *Archives Pediatr Adolescent Med* 1998; 152: 781–786.
- [13] McGarvey EL, Clavet GJ, Mason W, Waite D. Adolescent inhalant abuse: environments of use. *Am J Drug Alcohol Abuse* 1999; 25: 731–741.

- [14] Dudek B, Gralewicz K, Jakubowski M, Kostrzewski P, Sokal J. Neurobehavioral effects of experimental exposure to toluene, xylene and their mixture. *Pol J Occup Med* 1990; 3: 109-116.
- [15] Riihimaki V, Savolainen K. Human exposure to m-xylene: Kinetics and acute effects on the central nervous system. *Ann Occup Hyg* 1980; 23 : 411-422.
- [16] Savolainen K, Kekoni J, Riihimaki V, Laine A. Immediate effects of m-xylene on the human central nervous system. *Arch Toxicol* 1984; 7: 412-417.
- [17] Rosenberg NL, Spitz MC, Filley CM, Davis KA, Schaumburg HH. Central nervous system effects of chronic toluene abuse—Clinical, brainstem evoked response and magnetic resonance imaging studies. *Neurotoxicol Teratol* 1988; 10: 489-495.
- [18] Ungvary G. The effect of xylene exposure on the liver. *Acta Morphol Hung* 1990; 38: 245-258.
- [19] Pyykko K. Effects of methylbenzenes on microsomal enzymes in rat liver, kidney and lung. *Biochim Biophys Acta* 1980; 633: 1-9.
- [20] Guzelian P, Mills S, Fallon HJ. Liver structure and function in print workers exposed to toluene. *J Occup Med* 1988; 30: 791-796.
- [21] Mattia CJ, LeBel CP, Bondy SC. Effects of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 879-882.
- [22] Myhre O, Fonnum F. The effect of aliphatic, naphthenic, and aromatic hydrocarbons on production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in rat brain synaptosome fraction: the involvement of calcium, nitric oxide synthase, mitochondria, and phospholipase A. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 119-128.

- [23] Calderón-Guzmán D, Espitia-Vásquez I, López-Domínguez A, Hernández-García E, Huerta-Gertrudis B, Coballase-Urritia E, et al. Effect of toluene and nutritional status on serotonin, lipid peroxidation levels and Na⁺/K⁺-ATPase in adult rat brain. *Neurochem Res* 2005; 30: 619-624.
- [24] Coskun O, Oter S, Korkmaz A, Armutcu F, Kanter M. The Oxidative and Morphological Effects of High Concentration Chronic Toluene Exposure on Rat Sciatic Nerves. *Neurochem Res* 2005; 30: 33-38.
- [25] Kurkner A, Canpolat L, Ozan E, Gokcimen A, Ozan S, Dogrul M. The effect of xylene inhalation on the rat liver. *Acta Physiol Hung* 1997; 85: 231-241.
- [26] Norton WN, Mattie DR, Kearns CL. The cytopathologic effects of specific aromatic hydrocarbons. *Am J Pathol* 1985; 118: 387-397.
- [27] Bakand S, Winder C, Khalil C, Hayes A. A novel in vitro exposure technique for toxicity testing of selected volatile organic compounds. *J Environ Monit* 2005; 8: 100-105.
- [28] Costa C, De Pasquale R, Silvari V, Barbaro M, Catania S. In vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. *Toxicol in Vitro* 2006; 20: 324-331.
- [29] Coleman CA, Hull BE, McDougal JN, Rogers JV. The effect of m-xylene on cytotoxicity and cellular antioxidant status in rat dermal equivalents. *Toxicol Lett* 2003; 142: 133-142.
- [30] Croute F, Poinot J, Gaubin Y, Beau B, Simon V, Murat JC, et al. Volatile organic compounds cytotoxicity and expression of HSP72, HSP90 and GRP78 stress proteins in cultured human cells. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1591: 147-155.
- [31] Nicholls DG, Ferguson SJ. *Bioenergetics 3*. San Diego (CA): Elsevier Science Ltd.. EEUU. 2002

- [32] Sccheffler IE. Mitochondria. New York: John Wiley and Sons; 1999.
- [33] Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxydative phosphorylation. IV. The respiratory chain. *Jour Biol Chem* 1955; 217: 429-438.
- [34] Jöbsis F. Spectrophotometric studies on intact muscle. I. Components of the respiratory chain. *Jour Gen Phys* 1963; 46: 905-928.
- [35] Schultz BE, Chan SI. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2001;30:23-65.
- [36] Vogel R, Wiesinger H, Hamprecht B, Dringen R. The regeneration of reduced glutathione in rat forebrain mitochondria identifies metabolic pathways providing the NADPH required. *Neurosci Lett* 1999; 275, 97-100.
- [37] Tanaka T, Nakamura H, Nishiyama A, Hosoi F, Masutani H, Wada H, et al. Redox regulation by thioredoxin superfamily; protection against oxidative stress and aging. *Free Radic Res* 2000; 33: 851-855.
- [38] Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 1997; 17: 3-8.
- [39] Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in state 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *Jour Bioenerg Biomembr* 1999; 31: 347-366.
- [40] Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 1961; 191: 144–148.
- [41] Nicholls DG. The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution. *Eur J Biochem* 1974; 50: 305–315.
- [42] Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1604: 77-94.

- [43] Lehninger AL. Mitochondria and calcium ion transport. *Biochem J* 1970; 119: 129-38
- [44] Nicholls DG, Akerman KE. Mitochondrial calcium transport. *Biochim Biophys Acta* 1982; 683: 57-88.
- [45] Brand MD. The stoichiometry of the exchange catalysed by the mitochondrial calcium/sodium antiporter. *Biochem J* 1985; 229: 161-166.
- [46] Rottenberg H, Marbach M. The Na⁺-independent Ca²⁺ efflux system in mitochondria is a Ca²⁺/2H⁺ exchange system. *FEBS Lett* 1990; 274: 65-68.
- [47] Gunter TE, Gunter KK, Sheu S, Gavin CE. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol Cell Physiol* 1994; 267: C313-C339.
- [48] Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R, Gunter K. Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calc* 2000 28: 285-296.
- [49] Jung DW, Baysal K, Brierley GR. The sodium-calcium antiport of heart mitochondria is not electroneutral. *J Biol Chem* 1995; 270: 672-678.
- [50] Zoccarato F, Nicholls DG. The role of phosphate in the regulation of the Ca efflux pathway of liver mitochondria. *Eur J Biochem* 1982; 127: 333-338.
- [51] Sparagna GC, Gunter KK, Sheu S, Gunter TE. Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *J Biol Chem* 1995; 270: 27510-27515.
- [52] Hansford RG. Physiological role of mitochondrial Ca²⁺ transport. *J Bioenerg Biomembr* 1994; 26: 495-508.
- [53] Zoratti M, Szabó I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1241: 139–176.

- [54] Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J* 1988; 255: 357-360.
- [55] Crompton M, Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12; 414-419.
- [56] Bernardi E, Basso E, Colonna R, Costantini P, Di Lisa F, Eriksson O, et al. Perspectives on the mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1365: 200-206.
- [57] Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 79-94.
- [58] Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341: 233-249.
- [59] Kim J, He L, Lemasters J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 463-470.
- [60] Zanotti A, Azzone GF. Safranin as membrane potential probe in rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1980; 201: 255-265.
- [61] Pedersen PL, Greenawalt JW, Reynafarje B, Hüllihen J, Decker GL, Soper JW, Bustamente E. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. *Methods Cell Biol* 1978; 20: 411-81.
- [62] Rajdev S, Reynolds IJ. Calcium green-5N, a novel fluorescent probe for monitoring high intracellular free Ca²⁺ concentrations associated with glutamate excitotoxicity in cultured rat brain neurons. *Neurosci Lett* 1993; 162: 149-152.

- [63] Staniek K, Nohl H. H₂O₂ detection from intact mitochondria as a measure for one-electron reduction of dioxygen requires a non-invasive assay system. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1413: 70-80.
- [64] Lemasters JJ, Hackenbrock CR. Continuous measurement and rapid kinetics of ATP synthesis in rat liver mitochondria, mitoplasts and inner membrane vesicles determined by firefly-luciferase luminescence. *Eur J Biochem* 1976; 67: 1-10.
- [65] Honma T, Sudo A, Miyagawa M, Sato M, Hasegawa H. Significant changes in the amounts of neurotransmitter and related substances in rat brain induced by subacute exposure to low levels of toluene and xylene. *Ind Health* 1983; 21: 143-151.
- [66] Rydzynski K, Korsac Z, Jedlinska U, Sokal JA. The toxic effects of combined exposure to toluene and m-xylene in animals. IV. Liver ultrastructure after subchronic inhalatory exposure. *Pol J Occup Med Environ Health* 1992; 5: 35-42.
- [67] Brautbar N, Williams J. Industrial solvents and liver toxicity: risk assessment, risk factors and mechanisms. *Int J Hyg Environ Health* 2002; 205: 479-491.
- [68] Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 2003; 278: 36027-36031.
- [69] Adam-Vizi V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1140-1149.
- [70] Garbe TR, Yukawa H. Common solvent toxicity: autoxidation of respiratory redox-cyclers enforced by membrane derangement. *Z Naturforsch* 2001; 56c: 483-491.

- [71] Hansch C, Leo A, Hoekman D. Xylene. Exploring QSAR hydrophobic, electronic, and steric constants. Washington: American Chemical Society; 1995.
- [72] Howard PH. Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals. Chelsea: Lewis Publishers, 1992.